

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Avaliação do efeito de compostos da classe de 3-triazol-5-fenil-telurotimidina em células de câncer de mama

Adriely Maria Oliveira Rocha

Pelotas-RS, 2019

Adriely Maria Oliveira Rocha

Avaliação do efeito de compostos da classe de 3-triazol-5-fenil-telurotimidina em células de câncer de mama

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador (a): Fabiana Kömmling Seixas

Coorientador: Tiago V. Collares

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas

Catálogo na Publicação

R672a Rocha, Adriely Maria Oliveira

Avaliação do efeito de compostos da classe de 3- triazol-5-fenil-
telurotimidina em células de câncer de mama. / Adriely Maria Oliveira
Rocha ; Fabiana Kömmling Seixas, orientadora. — Pelotas, 2019.

65 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade
Federal de Pelotas, 2019.

1. Azt. 2. Telúrio. 3. Neoplasia de mama. 4. Triplo- negativo. 5.
Antitumorais. I. Seixas, Fabiana Kömmling, orient. II. Título.

CDD : 616.994

Elaborada por Maria Beatriz Vaggetti Vieira CRB: 10/1032

BANCA EXAMINADORA

Dr^a: Bruna Silveira Pacheco (UFPEL/CDTec)

Prof^a.Dr^a. Lucielli Savegnago (UFPEL/CDTec)

Prof^a. Dr^a. Fabiana Kömmling Seixas (Orientadora, UFPEL/CDTec)

Aos meus pais Cláudio e Mônica e aos meus irmãos Cleber, Marcos e Alex que sempre estiveram ao meu lado torcendo pelo meu sucesso. Com carinho.

Dedico

Agradecimentos

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades

Aos meus pais Cláudio e Mônica que me ensinaram o valor da perseverança da honestidade e do trabalho. Por sempre me apoiarem e pelo amor que nunca me faltou;

Aos meus irmãos Cleber, Marcos e Alex pelo incentivo e pelas palavras de carinho sempre que precisei;

A Magna, Poliana e Luanna pela amizade em todos os momentos;

Aos meus sobrinhos Vinícius e Davi por serem luz na minha vida;

Espero um dia poder compensar minhas ausências;

A toda a minha família pela torcida ao longo dessa jornada;

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Oncologia;

Em especial a Victória Mascarenhas, Mariana Sonego e Fernanda Severo por toda a ajuda e ensinamentos;

Aos amigos de sempre Priscila, Mariene, Isabelle, Pamela, Bruna, Júnior e Juliana que estiveram ao meu lado discutindo temas científicos ou não. Por deixarem essa jornada mais leve.

Aos meus amigos e colegas do Banco de Sangue da Santa Casa de Pelotas pela confiança e pelo respeito que sempre tiveram com meu trabalho;

A minha orientadora, Fabiana Seixas, pela oportunidade, incentivo e pela orientação;

Ao meu coorientador Tiago Collares, pela atenção e disponibilidade sempre que necessário;

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho meu carinho e gratidão.

Resumo

ROCHA, Adriely. **Avaliação do efeito de compostos da classe de 3-triazol-5-fenil-telurotimidina em células de câncer de mama. 2019. 65 fls** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A azido-3-desoxitimidina (AZT) é um nucleosídeo inibidor da transcriptase reversa com atividade antitumoral que vem sendo revitalizada através da inserção de moléculas que potencializam seu efeito. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito e os mecanismos subjacentes da morte celular do AZT e seus derivados em linhagens celulares de câncer de mama humano. Esta neoplasia é o segundo tipo de câncer mais comum em todo o mundo e o mais frequente entre as mulheres. A quimioterapia utilizada atualmente é muitas vezes limitada devido, principalmente, a toxicidade e ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos utilizados. Com essa problemática, pesquisadores vêm demonstrando grande interesse no uso de nucleosídeos, já que estes possuem uma vasta aplicação biológica e uma estrutura favorável a modificações. O efeito inibitório do AZT e seus derivados (**1a** e **1b**) foi determinado pelo ensaio de MTT, análises de citometria de fluxo foram utilizados para avaliar, a indução de apoptose e a distribuição no ciclo celular. Por último, também foi analisado o efeito da combinação dos derivados **1a** e **1b** com doxorrubicina. O ensaio de MTT mostrou que os derivados do AZT diminuíram a taxa de proliferação celular nas concentrações de 12,5 µM em 48h, enquanto o AZT comercial apresentou baixo potencial antitumoral. Na análise por citometria de fluxo, foi observado que os derivados do AZT não induzem a apoptose na concentração testada e promovem a parada do ciclo celular na fase S. Quando os derivados foram combinados a doxorrubicina foi demonstrado aumento significativo do efeito inibitório nas células de carcinoma de mama quando comparados aos tratamentos individuais. Portanto, esses compostos são potenciais agentes terapêuticos para o câncer de mama.

Palavras-chave: AZT, telúrio, neoplasia de mama, triplo negativo, antitumorais.

Abstract

ROCHA, Adriely. **Evaluation of the effect of compounds of the class of 3-triazol-5-phenyl-telthothymidine in breast cancer cells. 65 fls** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Azido-3-deoxythymidine (AZT) is a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with antitumor activity that has been revitalized through the insertion of molecules that potentiate its effect. The objective of this study was to investigate the effect and underlying mechanisms of cell death of AZT and its derivatives on human breast cancer cell lines. This neoplasm is the second most common type of cancer in the world and the most frequent among women. Chemotherapy currently used is often limited mainly due to the toxicity and development of drug resistance. With this problem, researchers have been showing great interest in the use of nucleosides, since they have a wide biological application and a structure favorable to modifications. The inhibitory effect of AZT and its derivatives (1a and 1b) was determined by the MTT assay, flow cytometric analyzes were used to evaluate, induce apoptosis and distribution in the cell cycle. Finally, the effect of combining derivatives 1a and 1b with doxorubicin was also analyzed. The MTT assay showed that AZT derivatives decreased the rate of cell proliferation at concentrations of 12.5 μ M in 48 hours, while commercial AZT showed low antitumor potential. In the flow cytometric analysis, it was observed that the AZT derivatives do not induce apoptosis at the concentration tested and promote cell cycle arrest in the S phase. When the derivatives were combined doxorubicin showed a significant increase of the inhibitory effect in the carcinoma cells compared to individual treatments. Therefore, these compounds are potential therapeutic agents for breast cancer.

Key words: AZT, tellurium, breast neoplasia, triple negative, antitumor.

Lista de Figuras

Figura 1: Modificações gerais estruturais e químicas de nucleotídeos e nucleosídeos.....	23
Figura 2: Características comuns no metabolismo e na interação fármaco - sítio ativo de análogos nucleósídeos.....	24
Figura 3: Fórmula estrutural do nucleosídeo azidotimidina.....	25

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação dos receptores moleculares e correlação com marcadores imuno-histoquímicos.	16
---	----

Lista de Abreviaturas

AZT – 3'-azido-3' - deoxitimidina, azidotimidina, zidovudina ou retrovir

AZT-DP – Azidotimidina difosfato

AZT-MP – Azidotimidina monofosfato

ARA-C - Citosina arabinosídeo

Abs - Absorbância

BRCA1 - *Breast Cancer Associated Gene 1*

BRCA2 - *Breast Cancer Associated Gene 2*

dFdC ou 2',2'-difluorodesoxicitidina – Gencitabina

dFdCTP – Difosfato de gencitabina

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

DOX - Doxorrubicina

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EGF - Fator de Crescimento Epidérmico

EO - Estresse Oxidativo

EPM - Erro Padrão da Média

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FDA – Agência reguladora de medicamentos e alimentos

GPx - Glutathione Peroxidase

HER2 - Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2

IC₅₀ - Concentração que inibe 50% do Crescimento

INCA - Instituto Nacional de Câncer

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OMS - Organização Mundial da Saúde

RE - Receptor de Estrogênio

RP - Receptor de Progesterona

SFB - Soro Fetal Bovino

RNA – Ácido ribonucleico

TNM - Tumor Nódulo Metástase

TTN - Tumores Triplo Negativos

Sumário

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
	2.1. Câncer de mama.....	13
	2.2 Subtipos moleculares do câncer de mama	14
	2.3 Subtipo Claudin-low (CL)	18
	2.4 Diagnóstico e tratamento para o Câncer de mama.....	19
	2.5 Análogos Nucleosídeos	21
	2. 6 Atividade antitumoral do AZT	25
	2.7 Compostos orgânicos de Telúrio.....	26
3	HIPÓTESE E OBJETIVOS	28
	3.1 Hipótese.....	28
	3.2 Objetivo Geral	28
	3.3 Objetivos Específicos	28
4	CAPÍTULO.....	29
	4.1 Manuscrito - Avaliação do efeito de compostos da classe de 3-triazol-5-fenil-telurotimidina em células de câncer de mama	29
5	CONCLUSÕES GERAIS	54
6	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO GERAL

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células as quais invadem tecidos e órgãos (INCA, 2018). As diversas entidades coletivamente chamadas de “câncer” resultam do acúmulo de mutações, instabilidades cromossômicas e alterações epigenéticas que promovem aumento da taxa de proliferação e dano celular (SØRLIE, 2004).

O câncer de mama é causado pelo desenvolvimento de células malignas no seio, estas se originam no revestimento das glândulas mamárias ou ductos da mama (epitélio ductal) (American Cancer Society, 2017). Atualmente os carcinomas de mama estão agrupados em subtipos intrínsecos conforme seu padrão de expressão gênica: Receptores de estrogênio negativo (RE -) (*basal-like*, *claudin-low*, e HER2+), receptor de estrogênio positivo (RE +) (luminal A, Luminal B) e *normal-like* (PEROU, 2010; PRAT et al., 2010; SØRLIE et al., 2001).

Deste modo a neoplasia de mama é o segundo tipo de câncer mais comum em todo o mundo com 2,09 milhões de casos (Organização Mundial de Saúde, 2018) e o mais frequente entre as mulheres (GINSBURG et al., 2017). No Brasil é a principal causa de morte entre o sexo feminino, estima-se que 59.700 novos casos apareçam para cada ano no biênio 2018-2019 (INCA 2018).

A quimioterapia é amplamente utilizada aproximadamente 60% de todos os pacientes com câncer de mama passam por este tratamento (CHAKRAVARTY et al., 2016). Dada a complexidade da doença, a maioria dos pacientes recebe regimes de múltiplas drogas e os efeitos adversos são, infelizmente, comuns (LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014). As complicações decorrentes da quimioterapia podem ser imediatas (logo após administração) ou tardias (manifestar-se durante um período prolongado de tempo, por vezes causando consequências a longo prazo (CAMPAGNA, 2016).

O que se espera de uma terapia antitumoral é uma alta capacidade de inibir a proliferação das células alteradas, um eficiente índice de remissão do tumor e uma baixa incidência de efeitos colaterais (SCHULTZE, 2013). Assim

sendo, tem-se aumentado a busca por substâncias com potencial antiproliferativo e com uma maior seletividade celular.

Diversos estudos têm demonstrado o potencial antitumoral de análogos nucleosídicos (SHELTON et al., 2016). Dentre os compostos desta classe, vale destacar a zidovudina ou azidotimidina (AZT) um análogo da timidina que tem capacidade de inibir (por AZT-5'-trifosfato) a DNA polimerase, bloqueando deste modo o alongamento da cadeia nascente da fita de DNA devido à falta de um grupo 3'-hidroxila (CELEWICZ et al., 2011) causando redução da atividade das telomerasas (WANG et al., 2017) e por consequência senescência e morte de células tumorais (HYUN et al., 2005; MITSUYA; BRODER, 1986). Além de possuir um grupamento azida o que lhe confere diversidade estrutural, permitindo modificações específicas, como a introdução de compostos que potencializem o efeito antitumoral (DE SOUZA, 2012; MUNCHE et al 2018).

Deste modo a inserção de átomos na molécula base do AZT torna-se uma alternativa ao desenvolvimento de derivados de AZT com potencial efeito antitumoral. Neste contexto, os compostos sintéticos contendo organotelúrio têm sido descritos com potencial atividade antitumoral (MUNCHEN, 2018)

Devido à importância farmacológica e ação antineoplásica documentada por essa classe de compostos, este estudo tem como objetivo avaliar a ação antiproliferativa de derivados de AZT contendo telúrio em células da linhagem tumoral de mama humana MDA-MB-231.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum em todo o mundo e o mais frequente entre as mulheres tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (GINSBURG et al., 2017). Segundo a organização mundial de saúde, em 2018, o câncer de mama era o mais mortífero para as mulheres, com 627.000 mortes. Representando cerca de um quarto dos novos casos diagnosticados entre elas (OMS, 2018).

Vale ressaltar que na América Central e do Sul as maiores taxas de incidência e mortalidade foram verificadas em países como Argentina, Brasil e Uruguai (DI SIBIO et al., 2016; MIGOWSKI et al., 2018). Neste sentido, no Brasil a principal causa de morte entre as mulheres é o câncer de mama, estima-se que 59.700 novos casos apareçam para cada ano no biênio 2018 - 2019 (INCA, 2018). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o primeiro mais frequente nas mulheres da região sul (73,07 / 100mil), sudeste (69,50 / 100mil), centro-oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36 / 100 mil). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21 / 100 mil) (INCA, 2018).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer o carcinoma de mama é uma doença multifatorial causada pela multiplicação desordenada de células da mama o qual gera células anormais que se multiplicam, formando um tumor. Os mais conhecidos fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer são: o envelhecimento, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, fatores hereditários e alta densidade do tecido mamário, razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama (American Cancer Society, 2017; INCA, 2016).

Ainda assim, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco sabe-se que as taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos (PAULA et al., 2010). Cerca de 12% dos cânceres de mama invasivos são diagnosticados em mulheres com até 45 anos, enquanto cerca de 60% em mulheres acima de 55 anos (HIMES et al., 2016). Por outro lado, os tumores mamários em mulheres jovens, com menos de 40 anos, representam cerca de

7% dos casos (ZIMMER et al., 2018) e estão associados a maior proliferação celular, pior prognóstico e maior mortalidade (MAGGARD et al., 2003).

A predisposição genética também é um importante fator de risco, cerca de 5 a 10% dos casos de câncer de mama são hereditários (ROWLAND et al., 2016). O risco individual aumenta proporcionalmente com o número de parentes próximos afetados pelo câncer de mama em idade precoce (COUTO; HEMMINKI, 2007). Grande parte dos casos são atribuídos a mutações germinativas nos genes de alta penetração BRCA1 e BRCA2 (Yang et al., 2011). Na presença de mutações patogênicas no gene BRCA1, o risco cumulativo de câncer de mama foi estimado em 87% até a idade de 70 anos. Em casos de mutações no gene BRCA2, o risco cumulativo de câncer de mama aos 70 anos é 84% (FORD et al., 1994; 1998; YAMAUCHI; TAKEI, 2018).

As mulheres portadoras do gene BRCA mutado têm aproximadamente 80% de risco de vida de desenvolver câncer de mama e 50% de risco de seus filhos herdarem a mutação genética (ROWLAND et al., 2016). Alguns outros genes de susceptibilidade para o câncer de mama com alta penetração são: TP53, PTEN, STK11 e CDH1 (SÁS, 2015).

Os fatores hormonais e reprodutivos também contribuem para aumento do risco do câncer de mama, dentre eles longa história menstrual (menarca precoce e/ou menopausa tardia), exposição prolongada a altas concentrações de estrogênio, nuliparidade ou ter o primeiro filho após os 30 anos de idade (Li et al., 2017; Samson et al., 2017). A influência da amamentação e uso de contraceptivos hormonais ainda são controversos (RAFFO et al., 2017). Outros fatores modificáveis relacionados ao estilo de vida foram identificados, incluindo obesidade, consumo de álcool e inatividade física (Petridou, 2018). A principal influência ambiental é a exposição prévia às radiações ionizantes, sendo diretamente proporcional à dosagem e inversamente proporcional à idade da mulher na época da exposição (SILVA; RIUL, 2011).

2.2 Subtipos moleculares do câncer de mama

O câncer de mama não é uma doença única, e sim uma doença heterogênea, com múltiplas formas histopatológicas, diferentes respostas à terapêutica e evoluções variáveis (BARROS; LEITE, 2015). A grande maioria destes tumores é derivado das células da unidade ducto terminal do lóbulo mamário (SØRLIE, 2004) e são conhecidos como carcinoma ductal invasivo, porém, como o câncer de mama é caracterizado por ser um grupo heterogêneo de doença, existem outros subtipos de carcinomas diagnosticados, como o tubular, lobular, mucinoso, micropapilar, medular e o papilar (INCA, 2018). A identificação de diferentes subtipos biológicos ocorre principalmente através do uso de técnicas, como muno-histoquímica e perfil de expressão gênica (NIELSEN et al., 2004) (Tabela 1).

As diretrizes atuais recomendam a determinação do receptor de estrogênio (RE), do receptor de progesterona (RP) e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) em todos os pacientes com câncer de mama invasivo (ELIZABETH et al., 2010; WOLFF et al., 2013). Além da avaliação de biomarcadores padrão que podem ser avaliados com imuno-histoquímica (RE, RP e HER-2), a contribuição de outros fatores, como taxa proliferativa e expressão de citoqueratinas (GERDES et al., 1983).

O progresso da biotecnologia permitiu sua classificação molecular por perfis de expressão gênica (BARROS; LEITE, 2015). Perou (2010) classificou os cânceres de mama em cinco subtipos intrínsecos conforme seu padrão de expressão gênica: luminal A e luminal B (RP positivo), superexpressor de HER-2, *basal-like* ou triplo-negativo (RE, RP e HER-2 negativo) e *normal-like* (PEROU, 2010).

Em 2007 Herschkowitz e colaboradores caracterizaram outro subtipo denominado *Claudin-low* (HERSCHKOWITZ et al., 2007). Esse subgrupo tumoral apresenta similaridades e diferenças tanto em expressão de genes como em ritmo de crescimento, vias de sinalização, composição celular, prognóstico e sensibilidade à terapêutica (BARROS; LEITE, 2015; CHAVEZ-MACGREGOR et al., 2017).

Tabela 1: Classificação dos receptores moleculares e correlação com marcadores imuno-histoquímicos.

Subtipo molecular	RE	RP	HER-2
Luminal A	Positivo e/ou	Positivo	Negativo
Luminal B	Positivo e/ou	Positivo ou negativo *	Negativo
Luminal B	Positivo e/ou	Positivo ou negativo **	Positivo
Her-2	Negativo	Negativo	Positivo
Tiplo-negativo ou basal-like	Negativo	Negativo	Negativo

*RP < 20% + ki67 >14% ** qualquer valor RP + qualquer valor de Ki 67

Abreviações: RE: Receptor de estrogênio; HER-2: Receptor do fator 2 de crescimento epidérmico humano; RP: Receptor de Progesterona (SIMONA MARIA FRAGOMENI, ANDREW SCIALIS, 2018).

Os subtipos luminais têm denominação advinda da similaridade que as células neoplásicas desses grupos possuem com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as chamadas células luminais (CIRQUEIRA et al., 2015). O subtipo Luminal A, cujo fenótipo é RE positivo e HER2 negativo, foi caracterizado pela elevada expressão de genes representados pelas células epiteliais luminais, como, por exemplo, as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 (SØRLIE et al., 2001) e baixa proliferação de Ki-67 (< 14%). É o mais comum 40% e o que tem melhor prognóstico, pois responde bem a hormonioterapia (RAFFO et al., 2017; Barros, 2016).

Por outro lado, o subtipo Luminal B, tem a mesma origem e exibe RE em alta porcentagem, os RP costumam ter baixa frequência e o Ki-67 é elevado (>14%). O HER2 pode estar expresso (Barros, 2016). Os tumores luminal B são caracterizados por baixa ou moderada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais, como, por exemplo, as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19. Este fenótipo está associado a pior prognóstico, sendo particularmente relacionado à recidiva tumoral (SØRLIE, 2004; SØRLIE et al., 2003; SØRLIE et al., 2001)

Os tumores superexpressores de HER-2 são em geral RE e RP negativos (Barros, 2016). Estes são caracterizados pela superexpressão de uma das moléculas da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico, o HER-2 e, concomitantemente, a superexpressão de sua proteína, é atualmente implicada como um importante biomarcador de prognóstico no carcinoma de mama (SØRLIE et al., 2006; TANNER et al., 2000). Responde bem ao tratamento com trastuzumab (LI et al., 2019).

O subtipo *Normal-like* ou mama-normal símile é o tumor com genes comuns ao epitélio normal (Barros, 2016) às células adiposas e a outras células do estroma (PEROU et al., 2000). Ainda não está clara sua distinção nem seu valor clínico (SØRLIE, 2004).

Por outro lado, o subtipo *basal-like* ou basalóide são, em grande maioria, triplo negativo em imuno-histoquímica (RE, RP e HER2). Eles apresentam algumas características de células mioepiteliais (CK5 e CK6) (BARROS, 2016). É um dos mais intrigantes subtipos tumorais, pois tem associação com pior prognóstico (TANNER et al., 2000; TURNER; REIS-FILHO, 2006). O subtipo *Claudin-low* (CL) são triplos negativos, com baixa expressão de claudinas que

são proteínas de adesão. São ricos em marcadores de células-tronco e de transição epitélio-mesênquimal possuem agressividade elevada (Barros, 2016).

2.3 Subtipo Claudin-low (CL)

Reconhecido em 2007, o subtipo molecular *Claudin-low* são tumores invasivos tipicamente triplo-negativos (RE negativo, RP negativo e HER-2 nulo), e caracterizado por uma baixa expressão de genes envolvidos com junções celulares ocludentes e glicoproteínas de adesão célula-célula, incluindo as claudinas 3, 4 e 7, as ocludinas e a E-caderina (GERHARD et al., 2012; HERSCHKOWITZ et al., 2007). São tumores que expressam características de células-tronco mamárias e células transicionais epitelial-mesênquimal (EMT) (HENNESSY et al., 2009; HERSCHKOWITZ et al., 2007). Desta forma exibem o fenótipo menos diferenciado ao longo da hierarquia de diferenciação epitelial mamária (PRAT et al., 2010). Estas células representam cerca de 19% de todos os casos de câncer de mama e incluem aqueles com pior prognóstico devido à sua natureza agressiva e metastática e altas taxas de recaída (DENT et al., 2007).

As alterações nos fenótipos celulares definidas como transição epitelial para mesênquimal (EMT) mostraram desempenhar um papel no processo tumorigênico (BRABLETZ et al., 2018). Neste sentido, células epiteliais aderentes perdem suas características epiteliais e adquirem, em seu lugar, propriedades mesenquimais, incluindo perda das junções de aderência alterações de expressão gênica, aumento do potencial de motilidade e, no caso de células cancerígenas, aumento da invasão, metástase e resistência à quimioterapia (GUPTA et al., 2009; KALLURI; WEINBERG, 2009; NIETO, 2013).

Outra característica dos tumores CL é a baixa expressão de moléculas de adesão celular, como por exemplo E-caderinas. Acredita-se que a perda da adesão célula-célula e junções celulares mediadas pela ligação homofílica da E-caderina permite que as células se dissociem do tumor primário, invadam os tecidos circundantes e migrem para locais distantes. (YANG; WEINBERG, 2008). A perda da expressão da E-caderina em associação com a transição

epitelial-mesenchimal (EMT) ocorre frequentemente durante a metástase do tumor. No entanto, as metástases retêm frequentemente a expressão de E-caderina, não é necessário um EMT para metástase e as metástases podem surgir a partir de aglomerados de células tumorais (PETROVA; SCHECTERSON; GUMBINER, 2016).

O subtipo CL também é descrito com baixa expressão de claudinas, proteínas que formam barreiras e poros paracelulares determinando a permeabilidade das junções estreitas (BARDET et al., 2017). As junções estreitas estão envolvidas na manutenção da polaridade celular, regulação da proliferação, diferenciação e outras funções celulares, devido à sua capacidade de selecionar proteínas sinalizadoras. Durante a aquisição do fenótipo neoplásico pelas células epiteliais ocorre a interrupção da adesão intracelular que são mantidas pelas junções aderentes e pelas junções estreitas (RÜFFER; GERKE, 2004).

Acredita-se que a perda da integridade epitelial seja devido a alterações nos níveis de claudinas e no consequente rompimento de comunicação paracelular, contribuindo para o aparecimento de espaços que propiciam a mobilidade celular e no aumento de suprimento nutricional para as células neoplásicas. Assim, o grau elevado de organização, tipicamente encontrado em tecido normal diferenciado, é muitas vezes perdido durante a evolução para tecido neoplásico (OUBAN; AHMED, 2010).

É consenso, que o subtipo CL é o tipo de carcinoma agressivo que confere prognóstico ruim e é encontrado em grande parte dentro do quadro clínico triplo negativo (TAYLOR et al., 2017). Apesar dos avanços terapêuticos e moleculares dos últimos anos, não há um alvo validado a ser bloqueado no subconjunto triplo negativo e a quimioterapia é a única terapia sistêmica disponível (FOGAÇA et al., 2017).

2.4 Diagnóstico e tratamento para o Câncer de mama

A triagem por mamografia é amplamente reconhecida como o método mais eficaz na detecção precoce do câncer de mama (BROEDERS et al., 2012). Além dos exames de imagem, a biópsia desempenha um papel fundamental no estabelecimento de um diagnóstico e na informação de

decisões cirúrgicas sobre o manejo do tumor primário, estadiamento axilar e a sequência da terapia (MOO et al., 2018).

No que confere ao tratamento do câncer de mama leva-se em conta as características dos tumores, como comprometimento dos linfonodos axilares, número de linfonodos comprometidos, tipo e grau histológico, tamanho do tumor primário, invasão vascular, expressão de receptores hormonais, expressão ou amplificação de receptores HER2, e a idade da paciente (SBOC, 2011).

Para o tratamento do câncer de mama localmente avançado é necessário abordagem multidisciplinar e, na maioria das vezes, envolve a administração de quimioterapia, cirurgia e radioterapia (GIORDANO, 2003). Para um tratamento mais agressivo inclui-se o uso de drogas quimioterápicas, cujo benefício consiste na redução da progressão tumoral e cerca de 60% de todos os pacientes com câncer de mama passam por quimioterapia (CHAKRAVARTY et al., 2016).

Os subtipos Luminal A e B, caracterizados pela presença de RE, são comumente tratados com terapia hormonal com bons resultados (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011; PARK; BERTOS, 2011). Enquanto que o anticorpo monoclonal trastuzumab é uma terapia bem sucedida e racionalmente concebida que proporciona benefícios clínicos significativos pacientes com câncer de mama HER-2 positivo (LI et al., 2019). Todavia para os subtipos *basal-like* e *claudin-low*, faltam opções terapêuticas específicas, devido à ausência de expressão de um alvo terapêutico reconhecível (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011; PARK; BERTOS, 2011).

Sem opções terapêuticas direcionadas disponíveis, o padrão de atendimento para tumores de mama triplo-negativos continua sendo a quimioterapia para doenças precoces e avançadas (JHAN; ANDRECHEK, 2017). A Doxorubicina (doxo) e a epirrubicina são os antracíclicos mais comumente usados no tratamento do câncer de mama. Em particular, com a doxo, sendo o principal medicamento do grupo (TOKARSKA-SCHLATTNER et al., 2006). Embora muitas mulheres se beneficiem dessa terapia, elas são expostas à toxicidade tardia das antraciclina, incluindo cardiotoxicidade e leucemia (KY et al., 2014; NEWELL; BRUN; FIELD, 2019).

Outras opções ao tratamento dos tumores triplo- negativos foi aprovado pela FDA em 2010, o inibidor de microtúbulos não taxano eribulina, o ensaio "EMBRACE" relatou uma melhora mediana na sobrevida global no triplo-negativos metastático de 4 a 7 meses (CORTES et al., 2011). A adição de agentes de platina à quimioterapia neoadjuvante também demonstrou aumentar taxas de resposta patológica completa em pacientes com esses subtipos (CORTES et al., 2011; TELLI et al., 2016).

O crescente entendimento da heterogeneidade biológica do tumor de mama triplo-negativo forneceu informações sobre a identificação de terapias sistêmicas potencialmente eficazes, incluindo agentes citotóxicos e direcionados. Inúmeras abordagens experimentais estão em andamento, e várias classes de medicamentos encorajadores, como inibidores de ponto de verificação imunológico, inibidores da polimerase poli (ADP-ribose), agentes de platina, inibidores da via fosfatidilinositol-3-quinase e inibidores do receptor de androgênio, estão sendo investigados para estes subtipos (Lee, 2017)

É interessante notar que os tumores do tipo triplo-negativo geralmente apresentam melhores respostas à quimioterapia em comparação com outros subtipos (CAREY et al., 2007; JHAN; ANDRECHEK, 2017). No entanto, esta abordagem é limitada pela má resposta, toxicidade e eventual resistência a poliquimioterapia (CORTES et al., 2011).

Assim, os tratamentos eficazes para tumores de mama triplo-negativos ainda permanecem desconhecidos e novas modalidades terapêuticas capazes de contornar os problemas devem ser estudadas. Uma classe de composto que tem chamado atenção dos pesquisadores são os nucleosídeos, nucleotídeos e análogos de bases, estes, estão na clínica há décadas para tratar patógenos virais e neoplasias, cerca de 20% dos pacientes em quimioterapia antineoplásica foram tratados com um ou mais desses análogos (SHELTON et al., 2016).

2.5 Análogos Nucleosídeos

O termo "nucleosídeo" foi usado pela primeira vez por Levene e Jacobs em 1909 (LEVENE & JACOBS, 1909). Estes consistem de uma nucleobase (derivada de purina ou pirimidina), ligada a uma porção de açúcar, ao serem fosforilados no interior da célula por quinases específicas, produzem um

nucleotídeo (DE SOUZA, 2012). Os análogos de nucleotídeos também possuem um grupo fosfato (P) ligado à porção de açúcar (figura 1) (Jordheim, 2013). Os nucleosídeos são heterociclos essenciais para a construção dos blocos moleculares da vida, como DNA e RNA (CHU, 2002). Estes, além de estarem envolvidos na síntese de DNA atuam na sinalização celular, regulação de enzimas e no metabolismo (JORDHEIM et al., 2013).

Análogos nucleosídeos citotóxicos são antimetabólitos que interferem com a síntese de ácidos nucleicos. Funcionam inibindo a síntese de DNA, porque apresentam uma estrutura espacial que simula a estrutura dos nucleosídeos fisiológicos. Como os compostos naturais, os análogos nucleosídeos são fosforilados na célula, havendo incapacidade da transcriptase reversa em distinguir qual o nucleosídeo natural e o artificial incorporado, o falso nucleosídeo impede a continuidade da formação da cadeia de DNA (Lopes, 2006). A incorporação de nucleosídeo ou nucleotídeo análogos no DNA podem induzir a terminação de alongamento de cadeia, o acúmulo de mutações em progênie viral ou a indução de apoptose (GALMARINI; MACKEY; DUMONTET, 2002; JORDHEIM et al., 2013).

Ambos os nucleosídeos e nucleotídeos desempenham papéis importantes na replicação e transcrição da informação genética, e, como tal, têm sido utilizados há décadas para quimioterapia antiparasitas, antibacterianas ou terapias antivirais (DE CLERCQ, 2004; DE CLERCQ; LI, 2016). No decorrer dos anos, numerosas modificações no esqueleto dos nucleotídeos foram feitas, incluindo alterações no grupo açúcar, nucleobase, ligação glicosídica e fosfato (SELEY-RADTKE; YATES, 2018a) (Figura 1). Essas modificações vão desde a adição de um substituinte ou a base heterocíclica ou açúcar, substituindo um átomo em qualquer uma das partes, movendo um átomo para um posição diferente, ou uma combinação dessas abordagens (SELEY-RADTKE & YATES, 2018).

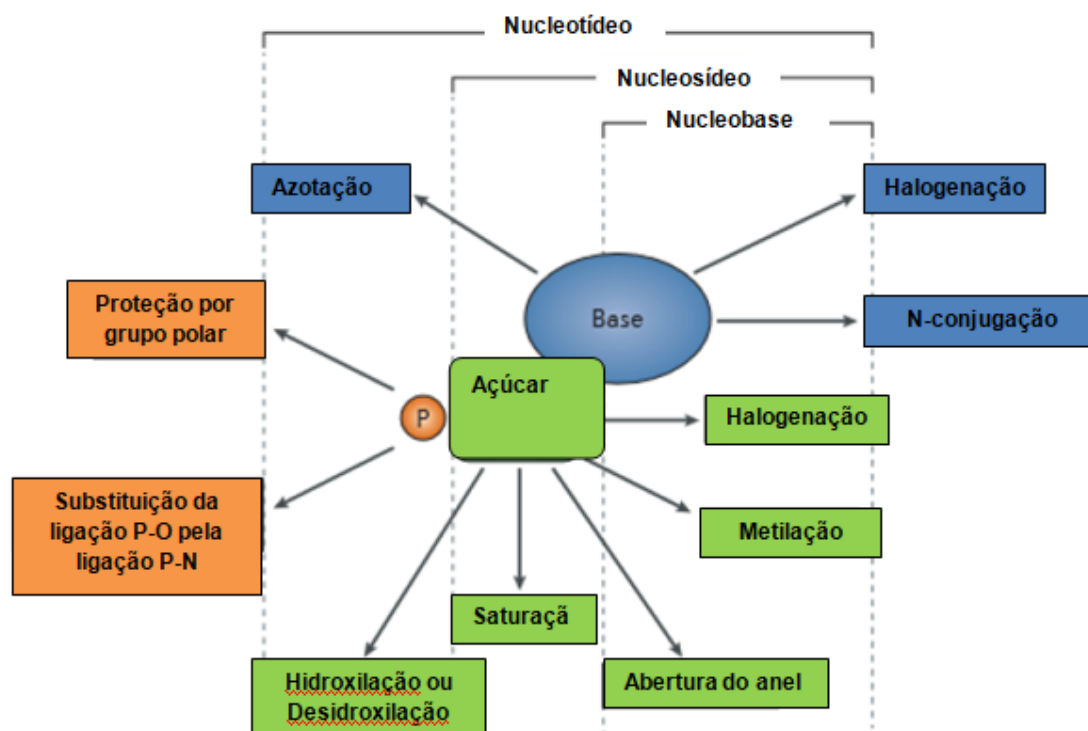


Figura 1: Modificações gerais estruturais e químicas de nucleotídeos e nucleosídeos. As diversidades químicas destes compostos baseiam-se em modificações, tais como halogenação, azotação, proteção por grupos polares e outras modificações mostradas nesta figura. N, azoto; O oxigênio. Modificado de (JORDHEIM et al., 2013)

Os análogos de nucleosídeos partilham características comuns incluindo o transporte mediado por transportadores de membrana, ativação por etapas metabólicas intracelulares que retêm o resíduo de nucleotídeos na célula e a formação de derivados de fosfato ativos (GALMARINI; MACKEY; DUMONTET, 2002). Os análogos de nucleosídeos citotóxicos estão entre os primeiros agentes quimioterápicos introduzidos para o tratamento médico do Câncer (J. et al., 2004).

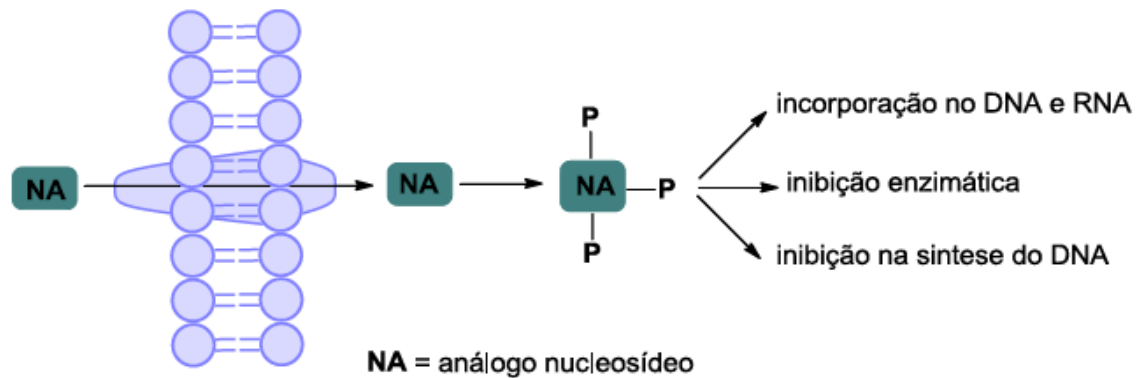


Figura 2: Características comuns no metabolismo e na interação fármaco –sítio ativo de análogos nucleosídeos. A maioria desses agentes são moléculas hidrofílicas e, portanto, exigem transportador especializados de proteínas para entrar nas células. Uma vez lá dentro, eles são ativados por intracelulares passos metabólicos para derivados de trifosfato. Derivados ativos de análogos de nucleosídeos podem exercer atividade citotóxica ao serem incorporados e alterando as macromoléculas de DNA e RNA ou interferindo com várias enzimas envolvidas na síntese de ácidos nucleicos, como o DNA polimerases e ribonucleído redutase. Essas ações resultam inibição da síntese de DNA e morte celular apoptótica (GALMARINI; MACKEY; DUMONTET, 2002).

Neste sentido a Citarabina ou Ara-C, um análogo da pirimidina, foi aprovado para uso clínico em 1969 pela FDA. O Ara-C é considerado um medicamento essencial pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017) devido à sua potente atividade contra muito Cânceres incluindo, Linfoma não-Hodgkin, leucemia mieloide, leucemia linfóide aguda e leucemia mieloide crônica (REESE; SCHILLER, 2013; SELEY-RADTKE; YATES, 2018a).

A gemcitabina é um análogo da desoxitidina (2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina – dFdC), onde os átomos de hidrogênio na posição 2' do carbono da desoxicitidina são substituídos por átomos de flúor (BOOKMAN, 2005). Atualmente este fármaco é utilizado para o tratamento de vários tumores sólidos como agente único ou em combinação com outros medicamentos quimioterápicos (BASTIANCICH; BASTIAT; LAGARCE, 2018). O mecanismo de ação da gemcitabina acontece através da sua incorporação no DNA e bloqueio da replicação, resultando em morte celular por apoptose (TOSCHI et al., 2005).

Um dos nucleosídeos mais conhecidos na medicina, é a Azidotimidina (figura 3). O 3'-Azido-3'-desoxitimidina (AZT) é um análogo de nucleosídeo usado no tratamento de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) devido

à atividade anti-retroviral, no entanto, foi inicialmente desenvolvido como agente antineoplásico (HORWITZ; CHUA; NOEL, 1964).

O potencial antineoplásico do AZT tem sido mostrado para várias linhas de células tumorais, incluindo aquelas derivadas de cólon (FANG et al., 2017), mama (ARMANDO; GOMEZ; GOMEZ, 2016; WAGNER et al., 2018), bexiga (DA ROSA et al., 2017; MUNCHEN et al., 2018) e esôfago (WANG et al., 2017).

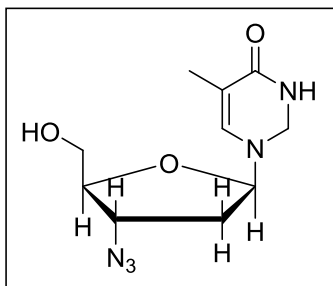


Figura 3: Fórmula estrutural do nucleosídeo azidotimidina. [Adaptado de Celewicz et al (2011)].

2. 6 Atividade antitumoral do AZT

A azidotimidina ou zidovudina (AZT) é um análogo de timidina que é convertido intracelularmente ao trifosfato de AZT (AZTTP) pela ação sequencial da timidina quinase de mamíferos (TK), timidilato quinase e nucleosídeo difosfato quinase, e é finalmente incorporada no DNA, onde bloqueia o alongamento da cadeia (FURMAN et al., 1986). Tem capacidade de inibição (por AZT-5'-trifosfato) de enzimas intracelulares, tais como a polimerase, bloqueando deste modo o alongamento da cadeia, causando senescência e morte de células tumorais (HYUN et al., 2005; MITSUYA; BRODER, 1986). Os trifosfatos contribuem para a citotoxicidade por competir com os nucleotídeos naturais na incorporação ao DNA por DNA polimerases (HUANG et al., 1991).

O AZT, foi originalmente desenvolvida em 1964 por Jerome Horwitz, um químico que estava à procura de um produto que pudesse interferir com a divisão celular, a base para o crescimento de tumores. Porém este se demonstrou-se pouco eficiente. Sendo em 1985, identificado como o primeiro composto com atividade antirretroviral, aprovado em março de 1987 para comercialização pela FDA para o tratamento de infecções de HIV (Mitsuya & BRODER, 1986; WU & ZHAO, 2007).

O primeiro relato da atividade inibitória do AZT sozinho foi feito em 1997 em linhagem tumoral de mama (MCF-7) (WAGNER et al., 1997). Posteriormente, Hyunet e colaboradores (HYUN et al., 2005) observaram que houve inibição do crescimento celular, redução do comprimento dos telômeros e senescência celular, todos estes fatores ocorreram devido a inibição da telomerase sob efeito do AZT. Essas características também foram relatadas em células tumorais de ovário humano, linhagem HO-8910 (LI et al., 2006), células tumorais de cólon (HCT116) (FANG et al., 2017) e esôfago (TE-11) (WANG et al., 2017).

Todavia, a molécula de AZT sozinha tem eficácia limitada, existem desvantagens da terapia com AZT, como a toxicidade medular, miopatia, captação de baixa barreira hematoencefálica e meia-vida curta no plasma (Salomón et al., 2002; Wu et al., 2007). Além da zidovudina desenvolver mecanismos de resistência que podem ser originados pelas próprias células tumorais (CAETANO-PINTO, 2017; JORDHEIM et al., 2013), recentemente identificou-se que a superexpressão do miR-3662 sob o controle do fator regulador do interferon (γ IRF4) e do proto oncogene c-Rel cooperam no crescimento de da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e resistência à Zidovudina (YASUI et al., 2018).

Desta forma, os esforços foram direcionados para o desenvolvimento e caracterização de novos derivados de AZT, o que leva à incorporação de estruturas como os organocalgênios (CELEWICZ et al., 2011). Compostos derivados de zidovudina contendo organocalcogênios demonstraram citotoxicidade em células de carcinoma de bexiga (MUNCHEN et al., 2018), mama (WAGNER et al., 2018) e pulmão (TABARELLI et al., 2017).

2.7 Compostos orgânicos de Telúrio

O elemento Telúrio (Te) faz parte do grupo 16 da tabela periódica também chamada família dos calcogênios, pertencente ao mesmo grupo do oxigênio, enxofre (S), selênio (Se) e polônio (Po) e tem propriedades químicas e físicas características (FISCHER, 2001; OGRA, 2017). Os compostos organocalcogênios são importantes intermediários e reagentes muito utilizados em síntese orgânica (TABARELLI et al., 2017)

Antigamente, o telúrio era aplicado para o tratamento de infecções microbianas antes da descoberta dos antibióticos. Há relatos de seu uso no tratamento da sífilis e da lepra (De Meio e Henriques, 1947). Atualmente compostos de telúrio possuem várias propriedades biológicas reconhecidas, como antimicrobiana, anti-helmíntica, antiprotzoária, antioxidante, imunomodulatória e antitumoral (EL et al., 2015; NOBRE et al., 2014; CUNHA, 2009; SREDNI, 2012). Nestes, o potencial antioxidante é, certamente, a propriedade farmacológica mais bem estudada (KUMAR et al., 2007; SARMA et al., 2010).

Evidências sugerem que grande parte da atividade biológica dos compostos possuem telúrio em sua estrutura está diretamente relacionada às suas interações químicas específicas com tióis endógenos, ou seja, esses compostos têm a capacidade de oxidar os grupamentos -SH, podendo inativar enzimas e/ou diminuindo a concentração de moléculas sulfidrílicas (REN et al., 2001; HASSAN et. al., 2009). Embora, o telúrio, em baixas concentrações, induza toxicidade aguda e crônica em uma variedade de organismos, vários estudos demonstraram que quantidades vestigiais de telúrio estão presentes em fluidos corporais, como sangue e urina (GOULLE et al., 2005), existem relatos na literatura atribuindo baixa toxicidade a diferentes compostos orgânicos de telúrio (COMPARSI et al., 2014).

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

Os derivados 3-triazol-5-fenil-telurimidina possuem atividade antitumoral em linhagem celular de carcinoma de mama do tipo triplo-negativo.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* de derivados de zidovudina em linhagens celulares de carcinoma de mama.

3.3 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito antiproliferativo dos compostos derivados de Zidovudina em células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231;
- Verificar a atividade de indução do apoptose de derivados de zidovudina em linhagem de carcinoma de mama;
- Observar o potencial de parada de ciclo celular das células de carcinoma de mama após tratamento com derivados de zidovudina.
- Avaliar o efeito da combinação de derivados de zidovudina com doxorubicina em linhagem celular de carcinoma de mama.

4 CAPÍTULO

4.1 Manuscrito - Evaluation of the effect of compounds of the class of 3-triazol-5-phenyl-telthothymidine in breast cancer cells

Manuscrito formatado conforme à revista *Biotechnology Research and Innovation*.

Evaluation of the effect of compounds of the class of 3-triazol-5-phenyl-telthothymidine in breast cancer cells

Adriely Maria Oliveira Rocha^a, Tiago Collares^a, Fernanda Severo Sabedra Sousa^a, Victoria Mascarenhas Borba^a, Mariana Gallio Fronza², Lucielli Savegnago^a, Oscar E. D. Rodrigues^b, Fabiana Kömmling Seixas^a

^a Postgraduate Program in Biotechnology (PPGB), Research Group on Cellular and Molecular Oncology - GPO, Center for Technological Development, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center for Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Corresponding author: Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n Capão do Leão, RS, Cep: 96010-900, Brazil.

E-mail: seixas.fk@gmail.com

Phone: +555332757350

Abstract: The *Claudin-low* subtype is "triple negative" breast tumors. They represent about 19% of all cases of breast cancer and include those with poor prognosis because of their aggressive and metastatic nature and high rates of relapse, for which a validated therapeutic target has not yet been found. In the search for substances with antitumor potential, 3-azido-3-deoxythymidine (AZT) is a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with antitumor activity that has been revitalized through the insertion of molecules that potentiate its effect. The objective of this study was to investigate the effect and underlying mechanisms of cell death of AZT and its derivatives on human breast cancer cell. The inhibitory effect of AZT and its derivatives (**1a** and **1b**) was determined by the MTT assay (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μ M and times of 24 and 48 h) inducing apoptosis and the cell cycle was investigated by flow cytometry. The MTT assay showed that AZT derivatives decreased the rate of cell proliferation at concentrations of 12.5 μ M, while commercial AZT showed low antitumor potential. In flow cytometric analysis, we demonstrate that the AZT derivatives do not induce apoptosis at the concentration tested and promote the cell cycle arrest in the S phase. These compounds containing tellurium in their formulation are potential therapeutic agents for breast cancer.

Keywords: AZT, tellurium, breast neoplasm, triple negative, anticancer agents, nucleosides

Introduction

Breast cancer is the second most common cancer in the world and the most frequent among women in both developed and developing countries (GINSBURG et al., 2017). In this sense, the Brazil the main cause of death among women, is breast cancer, it is estimated that 59,700 new cases appear for each year in the biennium 2018-2019 (INCA, 2018).

In this sense, breast neoplasm is not only a single disease, but heterogeneous, with multiple histopathological forms, different responses to therapy and variable evolutions (BARROS; LEITE, 2015). However, with the progress of biotechnology, the molecular classification of breast cancers through gene expression profiles was allowed (PRAT et al., 2010).

The Claudin-low (CL) subtypes are "triple negative" (RE-RP- and HER2-) and characterized by a low expression of genes involved with cell-cell adhesion glycoproteins, including clavinin 3, 4 and 7; the occludins and E-cadherin (HERSCHKOWITZ et al., 2007). They represent about 19% of all cases of breast cancer and include those with poor prognosis because of their aggressive and metastatic nature and high rates of relapse (DENT et al., 2007). Chemotherapy is widely used for breast cancer (CHAKRAVARTY et al., 2016). Given the complexity of the disease, most patients receive multiple drug regimens and the adverse effects are unfortunately common (LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014). What is expected of antitumor therapy is a high ability to inhibit altered cell proliferation, an efficient rate of tumor remission, and a low incidence of side effects (SCHULTZE, 2013). Therefore, the search for substances with antiproliferative potential and with greater cell selectivity has been increased.

Several studies have demonstrated the antitumor potential of nucleoside analogs (SHELTON et al., 2016). Among the compounds of this class, zidovudine or azidothymidine (AZT) is a thymidine analogue that has the ability to inhibit DNA polymerase (AZT-5'-triphosphate), thereby blocking the elongation of the nascent strand of the DNA strand due and the absence of a 3'-

hydroxyl group (CELEWICZ et al., 2011) causing a reduction in telomerase activity (WANG et al., 2017) and consequently senescence and death of tumor cells (HYUN et al., 2005; MITSUYA; BRODER, 1986). In addition to possessing a group azide, which gives it structural diversity, allowing specific modifications, such as the introduction of compounds that potentiate the antitumor effect (DE SOUZA, 2012).

Thus, insertion of atoms into the base molecule of AZT becomes an alternative to the development of AZT derivatives with potential antitumor effect. In this context, synthetic organotin-containing compounds have been described as promising antioxidant agents (BANDEIRA et al., 2018). There are reports in the literature attributing important antioxidant properties and low toxicity to different organic compounds of tellurium (COMPARSI, 2014). In addition to antimicrobial, anti-helminthic, antiprotozoal, anti-oxidant, immunomodulatory and antitumor activity (EL et al., 2015; CUNHA, 2009; SREDNI, 2012; WEINSTEIN et al., 2014).

Due to the pharmacological importance and antineoplastic action documented by this class of compounds, this study aims to evaluate the antiproliferative action of AZT derivatives containing tellurium in cells of the human breast tumor line MDA-MB-231.

Material and Methods

Chemical Synthesis of Compounds

The compounds were synthesized by LabSelen NanoBio Laboratory in the Chemistry Department of the Federal University of Santa Maria – RS and have already had their anticancer potential demonstrated in human bladder cancer strains in the work of Munchen et al. (2018)

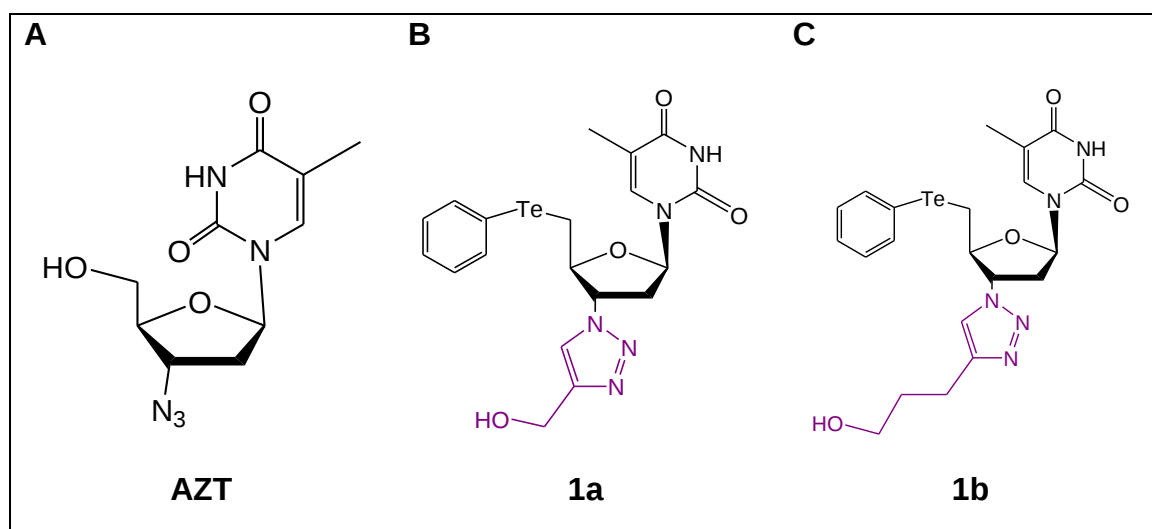


Figure 1: Chemical structure of the AZT molecule 3-triazoil-5-phenyl-tellurothymidine (A) and its derivatives. The molecule 7m (B) contains the aryl group and tellurium atom; while the 7r (C) molecule in addition to the aryl and tellurium atoms also has two more carbons at the 3 'position of the triazole ring.

The stock solutions of the compounds were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) at a concentration of 40.000 μM (standard AZT) and 20.000 μM of the **1a** and **1b** compounds from which the use solutions prepared in culture medium were made. The concentrations tested ranged from 6.25 μM to 100 μM . The control group, in all experiments, were the cells incubated only in medium and for the vehicle control group, the cells were incubated in medium with 0.2% DMSO. This concentration had no effect on cell growth and survival. The results obtained are derived from three independent experiments performed in triplicate.

Cell Culture

The human breast cancer cell line MDA-MB-231 was obtained from Banco do Rio de Janeiro (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil). MDA-MB-231 cells were cultured in Leibovitz L-15 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.2 mg/ml sodium bicarbonate and cultured at 37° C in a 95% atmosphere of humidified air without CO_2 .

Determination of cytotoxicity of synthetic AZTs against MDA-MB-231

The cell viability of MDA-MB-231 after treatment with the compounds was determined by spectrophotometric quantification of the reduction of MTT (3- [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) to crystals of formazan. Cells were seeded at a density of 2×10^4 cells per well in 96-well culture dishes treated with different concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μ M the AZT derivatives. After the test period, the medium was replaced with MTT solution of 0.5 mg/ml in medium and the plate was kept in an oven for 3 hours at 37° C. After the medium was aspirated and the formazan crystals were diluted with 100 μ L of DMSO/well. Subsequently, the absorbance at 492 nm was measured using a spectrophotometer (Thermo Plate TP-Reader). The percentage of proliferation (%) was calculated by the formula: $[1 - (\text{Mean Absorbance of Treated Cells} / \text{Control Mean Absorbance})] \times 100$. Values that inhibit 50% growth (IC_{50}) were determined from the data from this experiment.

Evaluation of Apoptosis Induction by Flow Cytometry

Cell death by apoptosis was assessed by flow cytometry using the Annexin V-7AAD apoptosis detection kit (Guava Technologies, Millipore Corporation) according to the manufacturer's instructions. MDA-MB-231 cells were grown in 12-well plates at a density of 1×10^5 cells/well and incubated for 48 h. Cells were then exposed to 12.5 μ M of zidovudine derivatives for 48 h best concentration and time observed in the MTT assay. A range of 2×10^4 to 1×10^5 treated cells (100 μ l) was added of Guava Nexin® reagent. Cells were incubated in the dark at room temperature for 20 minutes and samples were read on the flow cytometer (Muse™ Cell Analyzer, Merck Millipore Corporation). This kit uses a dual staining protocol in which live healthy cells are Annexin V and 7-AAD negative; whereas cells in early apoptosis are Annexin V positive and 7-AAD negative and cells in late apoptosis/death are positive for both Annexin V and 7-AAD.

Cell cycle analysis

Cells (2×10^5 cells per well) were cultured in triplicate in 12-well plates for 24 hours and synchronized by growth without serum for another 24 hours. These were treated with a concentration of 12.5 μ M for 48 h. After the treatment the cells were harvested, fixed with 70% ethanol and stained according to the

manufacturer. Analysis is performed on the flow cytometer (Guava easyCyte™ Plus, EMD Millipore Corporation, Billerica, USA).

Combined studies of AZT 7m and 7r derivatives with doxorubicin

In determining whether AZT **1a** and **1b** derivatives with doxorubicin could cooperatively induce cell death, MDA-MB-231 cells were treated with 0.5, 1 and 2 µM doxorubicin and **1a** or **1b** at 6.25, 12.5 and 25 µM for 48 h. Cell viability was measured by the MTT assay as described above.

***In silico* assessment of pharmacokinetics**

The ADMET predictor software from Simulations Plus was utilized to predict absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity properties of compounds AZT and the tested derivatives **1a** and **1b**, using artificial neural network ensemble (ANNE) models trained with well-defined drugs, and was chosen for its high prediction accuracy, and descriptor sensitivity analysis capabilities. The *in vivo* drug absorption, permeability, distribution and toxicology were thus simulated based on physicochemical properties and PK parameters. We also predicted the metabolism and excretion of compounds through the affinity with all the cytochromes oxidases (Phase I) and the isoforms of UDP-glucuronosyltransferases, (Phase II) responsible for glucuronidation of compounds. Additionally, we performed a pharmacokinetics simulation in humans at the dosage 10 mg/kg, to predict oral absorption, bioavailability, oral plasma concentration–time, and distribution profile.

Statistical analysis

The results were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). The IC₅₀ value was determined using GraphPad Prism 7.0 software. All assays were performed at least three times. To compare the statistical differences between multiple groups in the MTT test, two-way ANOVA followed by the Bonferroni test was used and for the other tests two-way ANOVA was used followed by the Tukey test. A value of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Effect of zidovudine-derived compounds **1a** and **1b** on cell viability through the MTT assay

The effect of zidovudine derivatives **1a** and **1b** on MDA-MB-231 cells was determined by observing cell viability at 24 and 48h after exposure of the cells at doses of 6.25 to 100 μM of these compounds. Both compounds inhibited 50% cell growth from the 25 μM concentration in the 24-hour time while in the 48-hour time the inhibition occurred from the 12.5 μM concentration. Demonstrating that the higher the concentration and longer exposure time of the cells to the compounds the greater the inhibition of cell growth.

Compound **1a** at concentrations of 12.5 and 25 μM showed a statistically significant difference between the concentrations, whereas at concentrations of 50 and 100 μM there was no difference. In the same way that its analog **1b** presented significant difference between the times of 24h and 48h in the concentrations of 6.25, 12.5 and 25 μM .

While the tested concentrations of 50 and 100 μM did not obtain significant difference. IC_{50} values at 24-hour time were 24.95 μM for the **1a** derivative and 21.61 μM for compound **1b**, whereas for the 48-hour time the IC_{50} of **1a** and **1b** were 11.76 and 9.62 μM , respectively (Table 1).

By analyzing the action of the compounds on breast tumor cells, it was observed that cytotoxicity was concentration and time dependent. These results show that both compounds **1a** and **1b** have antitumor potential in the analyzed breast line, however, compound **1b** is more effective in inhibiting tumor growth. Commercial AZT, on the other hand, did not prove to be toxic at any of the concentrations tested and, therefore, it was not possible to calculate the IC_{50} (figure 2).

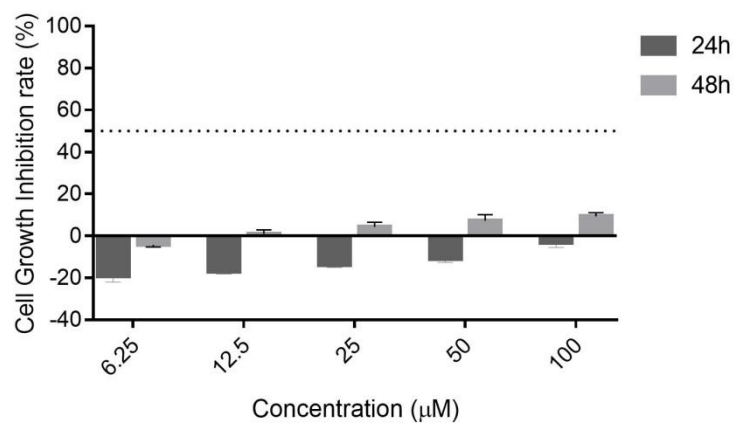
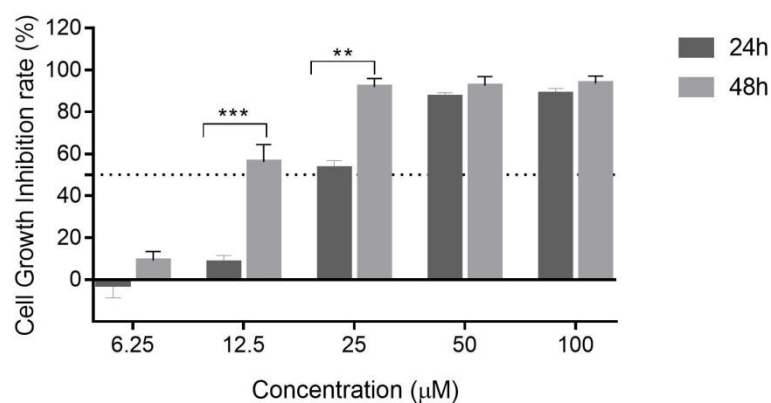
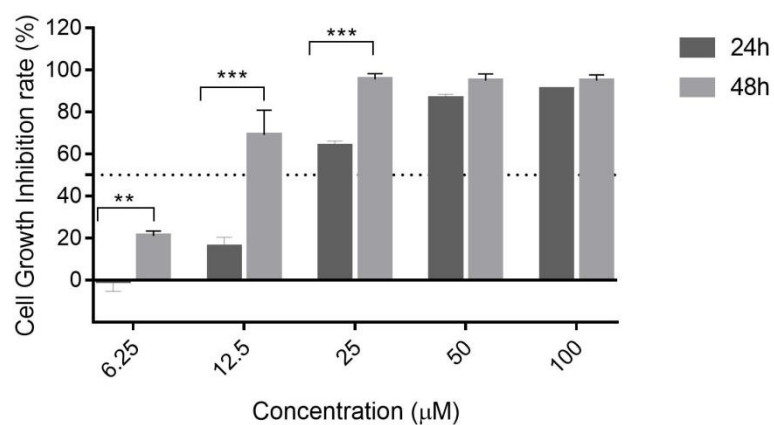
A**B****C**

Figure 2: Cell viability in MDA-MB-231 strain after 24 and 48 hours of incubation at different concentrations of AZT (A), **1a** (B) and **1b** (C) compounds. The results were performed by mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). For this analysis, two-way ANOVA analysis was used, followed by Bonferroni multiple comparisons test. It should be noted that $p \leq 0.05$ was considered significant. The vehicle used in the tests was DMSO

Table 1: IC₅₀ values of AZT derivatives in the treatment of human breast cancer cells

Compound	24h - IC ₅₀ (μM)	48h - IC ₅₀ (μM)
1^a	24.95 ± 6.05	11.76 ± 2.97
1b	21.61 ± 2.44	9.62 ± 1.35

All data were obtained from three independent experiments and are presented with mean ± standard deviation of the mean.

Analysis of the induction of apoptosis by 1a and 1b derivatives in MDA-MB-231 cells

To examine whether zidovudine derivatives **1a** and **1b** could induce apoptosis in MDA-MB-231 cells, the induction of apoptosis was determined quantitatively by the flow cytometry assay. The results obtained (figure 3) demonstrated that the compounds did not cause apoptosis in the cells, so no significant differences between the groups ($p < 0.05$) at the tested concentration of 12.5 μM were observed in the 48-hour time.

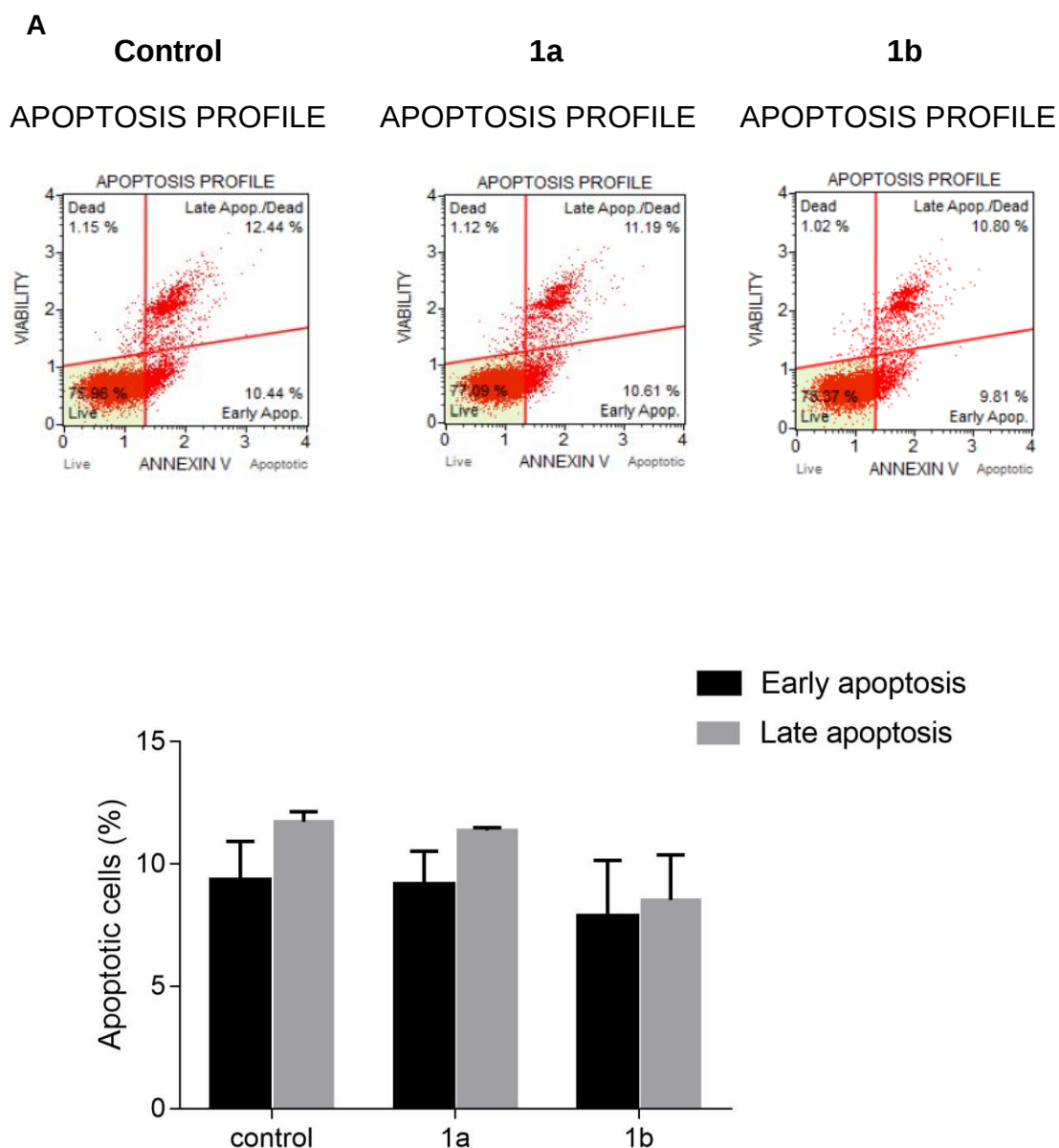


Figure 3: Induction of apoptosis by **1a** and **1b** derivatives in MDA-MB-231 breast cancer cells. Cells treated with 12.5 μ M of 7m and 7r derivatives for 48 h were examined for apoptosis by flow cytometry. (A) Flow cytometry graphs for Annexin V-7AAD analysis (B) Percentage of apoptotic cells. Data represent the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of three independent replicates.

Induction of cell growth arrest through the 1a and 1b derivative compounds

To elucidate the activity of the compounds derived from AZT, the mechanism responsible for the effect of cell growth inhibition was evaluated. The cell cycle distribution profile was examined by flow cytometry with

propidium iodide staining. In figure 4 it is observed that the derivative **1a** increased the number of cells in the S phase (27.3%) as well as its analogue **1b** (28.2%) in relation to the control (19.35%) demonstrating cycle stop in the S phase. which in the G₀/G₁ phase stopped the control (51.75%) and reduced the treatments (40.55%) to **1a** and to the derivative **1b** (44.9%). In the G₂ / M phase the control had a 19.7% cellular distribution and the zidovudine derivatives had a cellular distribution of **1a** (16.9%) and **1b** (19.95%) for this phase of the cycle.

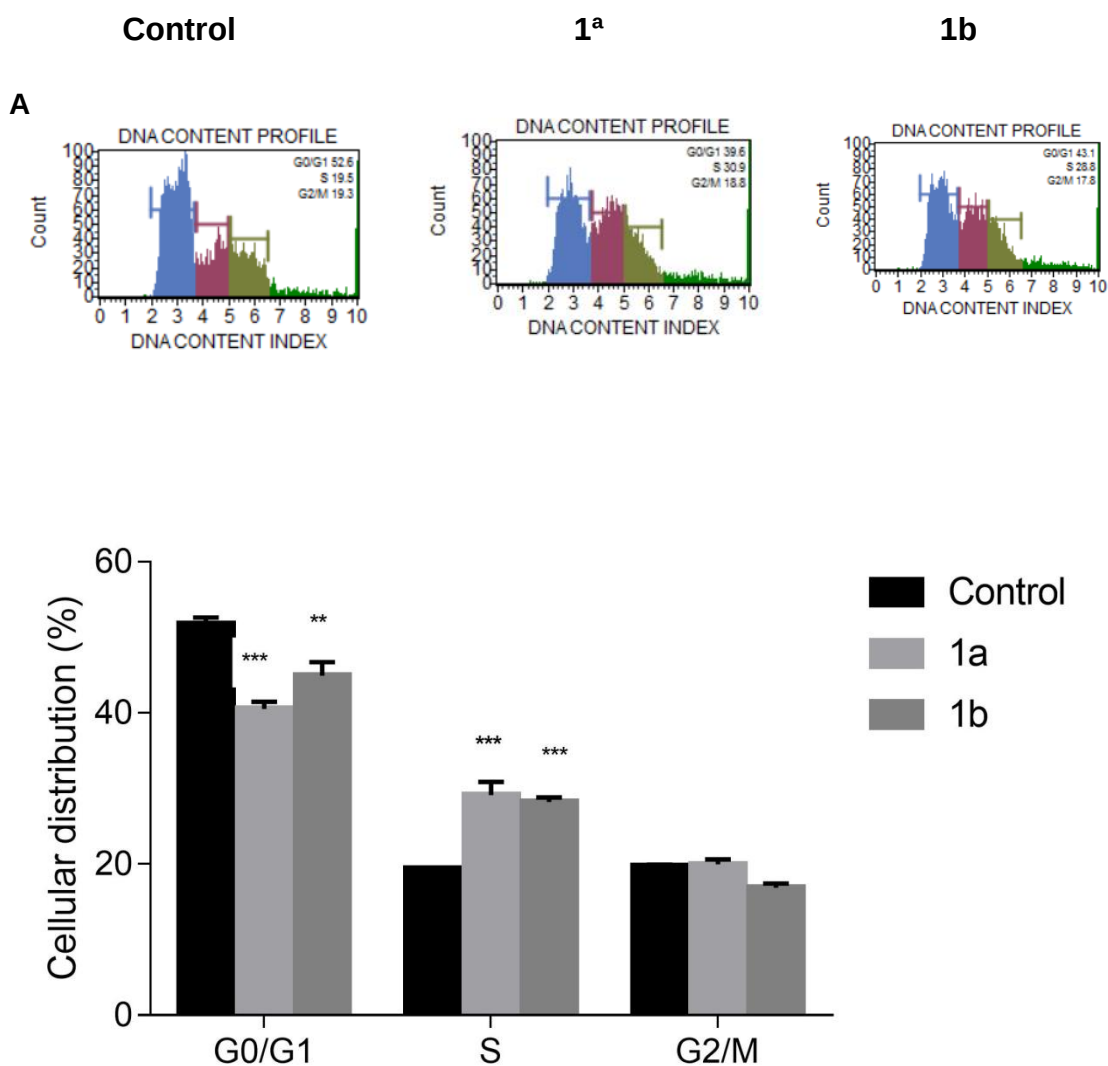


Figure 4: Induction of cell cycle arrest by **1a** and **1b** derivatives in MDA-MB breast cancer cells. Cells were treated with 12.5 μ M of the derivatives for 48 hours the distribution of the cells at each stage of the cell cycle was analyzed by flow cytometry with propidium iodide staining. (A) shows the DNA content histogram and (B) shows the percentage of cells in each cycle phase. Data represent the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of three independent experiments. Two way ANOVA followed by tukey was applied. * p = 0.001.

Combination of derivatives **1a** and **1b** with doxorubicin

At the concentration of 6.25 μM the inhibitory effect of the **1a** derivative when combined with doxorubicin (at concentrations of 0.5, 1 and 2 μM) was 51.8, 50.64, 54.2 was higher than the inhibition of **1a** alone (9.1%) and the single doxorubicin 34.2, 33.6, 58.75%. Likewise, at the 12.5 μM concentration the inhibition of **1a** cell growth alone was 56% when the compound was combined to doxorubicin the inhibitory effect was 74.9, 72.49 and 75%. At these concentrations inhibition of the derivatives and doxorubicin demonstrated superior results to the compound and doxorubicin alone. Combinations of doxorubicin with compound **1a** have a significant difference from the compound alone at concentrations of 6.25 and 12.5 μM (figura 5).

At the concentration of 25 μM the inhibitory effect was 91% of the compound alone and when combined with doxorubicin the percentage of inhibition was 100% and the combinations had no significant difference in relation to the compound alone.

For compound **1b** at the concentration of 6.25 μM the inhibitory effect of the combined doxo derivative was 54.6, 52.2, 51.2% showing a greater cytotoxicity than the **1b** derivative alone (12.6%) and the single doxo (34.2, 33.6, 58.75 %). At this concentration the combinations had a significant difference in relation to the individual **1b** derivative.

At the concentration of 12.5 μM the inhibitory effect of the **1b** derivative alone was 68.9% when combined with the inhibitory effect was 78.8, 76.5 and 80.4%. At the concentration of 25 μM the inhibitory effect was 95% of **1b** isolated and when combined with doxorubicin the percentage of inhibition was 100%. Both concentrations did not differ significantly from compound **1b**.

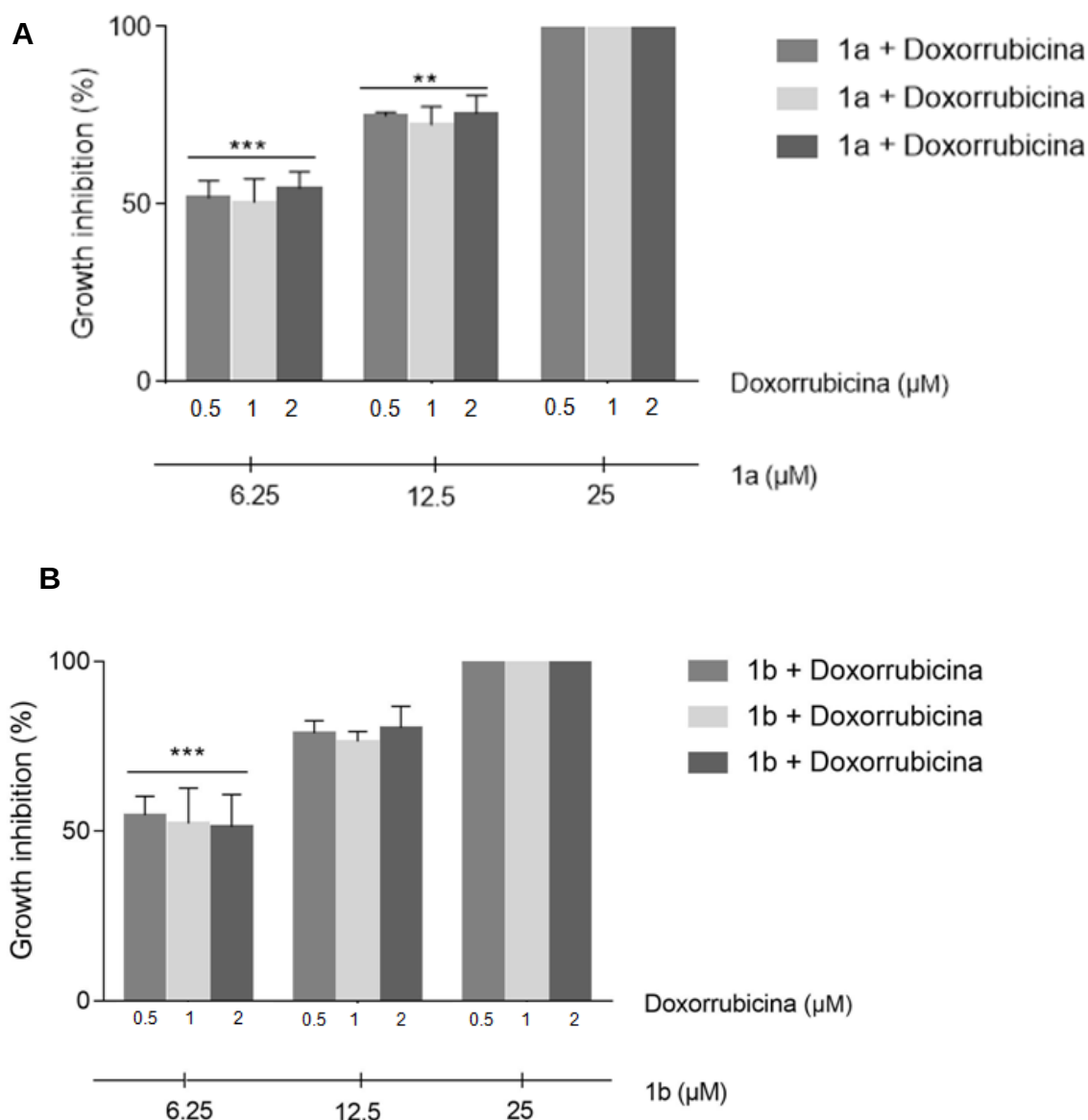


Figure 5: Inhibition of growth induced 7m and 7r derivatives with doxorubicin in breast cancer MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated with AZT 7m or 7r derivatives at concentrations of 6.25, 12.5 and 25 μM and doxorubicin at 0.5, 1 and 2 μM for 48 h. Inhibition of growth of individual treatments and combined treatment was measured by MTT assay. Tukey post-hoc two-way ANOVA was used to analyze statistical significance. * Means statistical difference between the control group (** p <0.01; *** p <0.001). The results represent the mean ± SEM of three independent experiments.

***In silico* assessment of pharmacokinetics**

In the Table 2 shows the bioavailability of compounds **1a**, **1b** and AZT. The AZT has greater solubility in gastric and intestinal fluid than in other fluids. On the other hand, the compounds **1a** and **1b** have a higher permeability in

tissues. Regarding plasma protein binding, 71.298% of the AZT molecule does not bind to plasma proteins, whereas 4.532% and 3.632% of the **1a** and **1b** molecules do not bind to these proteins respectively.

Regarding metabolism, both compounds are metabolized in the liver and have an intrinsic clearance rate of enzyme metabolism in phase I of 50.674 $\mu\text{l} / \text{min/nmol}$ enzyme in CYP 3A4 (**1a**), 167.760 $\mu\text{l/min/nmol}$ enzyme in the enzyme CYP 3A4 (**1b**) and 26.208 $\mu\text{l/min/nmol}$ enzyme in CYP3A4 (AZT). While in phase II it acts is UGT1A for **1a** and **1b** and UGT2BT for AZT. The recommended daily oral dose is 131.051 mg/kg, 125.896 mg/kg and 443.625 mg/kg for **1a**, **1b** and AZT respectively. In this sense, compounds **1a** and **1b** are not toxic to chromosomes, since the molecule of AZT has a mutagenic risk. The main adverse effects of these compounds are: skin allergies, possible hepatic lipidosis, can be toxic to the reproductive system and interaction with the enzymes Alkaline phosphatase (ALP), gamma glutamyl transferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT).

During the simulation of absorption of **1a**, **1b** and AZT (10 mg/kg), we can observe that the % of absorption in 24h is 99.93%, 99.99% and 96.32% in humans respectively. The bioavailability of the compounds in 24h is 97.70% (**1a**), 98.01% (**1b**) and 81.35% (AZT) in humans. The maximum plasma concentration in 24 hours is 215.830 ng/ml, 192.190 ng/ml and 91.48 ng/ml for **1a**, **1b** and AZT respectively in humans. The volume of distribution of **1a** and **1b** are 30.783 L/kg and 30.789 L/kg, and for AZT 46.643 L/kg in humans.

Table 2. Physical chemical properties of compounds **1a**, **1b** and AZT through in silico analysis by ADMET predictor software.

PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES				
	1a	1b	AZT	
Permeability in the jejunum	2.615 cm/s	2.120 cm/s	1.349 cm/s	
Permeability in tissues	40.221 cm/s	36.895 cm/s	31.448 cm/s	
Skin permeability	2.842 cm/s	8.679 cm/s	0.039 cm/s	
Solubility in water	14.628 ng/ml	10.013 ng/ml	17.593 ng/ml	
Solubility in gastric fluid	3.642 mg/ml	1.058 mg/ml	41.229 mg/ml	
Solubility in intestinal fluid (not fed)	0.316 mg/ml	0.040 mg/ml	31.667 mg/ml	
Solubility in intestinal fluid (fed)	20.883 mg/ml	11.083 mg/ml	23.278 mg/ml	
Penetration into the blood-brain barrier	High Log 0.279	High Log 0.308	High Log 0.290	
Mean plasma concentration	Log 0.998	Log 1.192	Log 0.879	
Percent not bound to plasma proteins	4.532%	3.632%	71.298%	
Distribution volume	0.556 L/kg	0.613 L/kg	0.674 L/kg	
METABOLISM				
Main metabolizing	Liver	Liver	Liver	

organ

Enzyme metabolism intrinsic clearance (rate) – Phase I	CYP 3A4 50.674 uL/min/nmol enzyme	CYP 3A4 167.760 uL/min/nmol enzyme	CYP3A4 26.208 uL/min/nmol enzyme
Phase II	UGT1A	UGT1A	UGT2BT

TOXICITY

Recommended daily maximum oral dose (acute toxicity)	131.051 mg/kg	125.896 mg/kg	443.625mg/kg
Toxicity in chromosomes	No	No	Yes, mutagenic risk
Awareness	Skin allergy	Skin allergy	No
	Possible hepatic lipidosis	Possible hepatic lipidosis	Possible hepatic lipidosis
	Toxic reproductive system in	Toxic reproductive system in	Toxic reproductive system in
Lethal dose mice	1124.585 mg/kg	1121.568 mg/kg	664.669 mg/kg
Adverse effects	Interaction with the ALP, GGT, AST, ALT	Interaction with the ALP, GGT, AST, ALT	Interaction with the ALP, GGT, AST, ALT

		enzymes		enzymes		enzymes	
		Not with LDH and FA	interact	Not with FA	interact LDH and	Not with FA	interact LDH and
General Toxicity (0-6)		2		2		3	

SIMULATION

10 mg/kg dose of drugs – humans

% of absorbed fraction in 24h		99.93%		99.99%		96.32%
Bioavailability in 24h		97.70%		98.01%		81.35%
Maximum plasma concentration in 24 hours		215.830 ng/ml		192.190 ng/ml		91.48 ng/ml
Plasma concentration time		2.56h		2.98h		2.07h
Distribution volume		30.783 L/kg		30.789 L/kg		46.643 L/kg

Abbreviations: gamma glutamyl transferase (GGT) enzyme; aspartate aminotransferase (AST); alanine aminotransferase (ALT); lactate dehydrogenase (LDH); alkaline phosphatase (ALP).

Discussion

Through the presented results we can verify that the MTT test demonstrated cytotoxicity of **1a** and **1b** in MDA-MB-231 cells with IC₅₀ of 24.95 and 21.61 μ M in 24 hours and 11.76 and 9.62 μ M in 48h, respectively. In this sense, we can observe that there was no early or late apoptosis at the

concentration tested. While in the cell cycle test, we obtained cycle stop in the S phase in the concentration previously mentioned.

The MTT reduction assay in which viable cells with active metabolism convert the reagent 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide to formazan crystals. Through this assay we can see that zidovudine **1a** and **1b**-derived compounds exhibited cytotoxicity against the MDA-MB-231 triple negative breast cancer tumor line inhibiting its cell growth by 50% from the 25 μM concentration in the 24-hour time. In addition to these findings, compounds (**1a** and **1b**) demonstrated cytotoxic activity in bladder carcinoma cells (5637) exhibiting a 50% inhibition at a concentration of 8.09 μM for the **1a** derivative and 1.99 μM for compound **1b** in 24 hours exposure (MUNCHEN et al., 2018). Compound **1b** is shown to be more effective in inhibiting tumor growth in both breast cancer and bladder carcinoma. According to Avendaño (2001), adding carbons in the structure increases the activity of the derivative in relation to its prototype.

Corroborating the results that compounds containing tellurium present as promising therapeutic agents for cancer, the Da Rosa (2017) study demonstrated the prominent cytotoxic action of tellurium-thymidine on bladder carcinoma cells with IC_{50} value of 6.61 μM in 24 h and 7.94 μM in 48 h of treatment compared to the compounds containing selenium and sulfur (DA ROSA et al., 2017).

The compounds of tellurium have several biological properties, such as antimicrobial, anthelmintic, antiprotozoal, antioxidant, immunomodulatory and antitumor (EL et al., 2015; NOBRE et al., 2014; R. CUNHA, 2009). In the present work, the use of antioxidant therapies has been demonstrated to be effective in the prevention of or minimizing oxidative damage in biomolecules (DALMOLIN et al., 2018; R. CUNHA, 2009), making them promising candidates for use in the development of antioxidant therapies. the body against cellular damage caused by oxidative stress (BANDEIRA et al., 2018).

It is consolidated that oxidative stress promotes damage to DNA, RNA, lipids and proteins. In addition to DNA fragmentation, reactive species of exigencia can cause the malfunction of the DNA repair system, contributing to the development of diseases, such as cancer (SOSA, 2013). In addition, organotheluric compounds promote inhibition of the thioredoxin / thioredoxin

reductase system (TrxR) (ENGMAN et al., 2003). A (TrxR) is overexpressed in many types of cancer and has been recognized as an anti-cancer target (ZHENG et al., 2019).

We know of the previously described activities of tellurium, we noticed an important issue in the development of new drugs, cell selectivity, so the derivatives **1a** and **1b** were previously tested by our research group in non-tumor cells in the CHO-k1 lineage. Through this study it was possible to observe a preference in inhibiting the growth of tumor cells rather than healthy cells by means of the MTT assay (MUNCHEN et al., 2018). The best action of a molecule on a specific target, rather than on healthy cells, is a desirable behavior for chemotherapeutic drugs.

Although, tellurium, in low concentrations, induces acute and chronic toxicity in a variety of organisms. However, several studies have shown that trace amounts of tellurium are present in body fluids such as blood and urine (GOULLE et al., 2005). Nevertheless, there are reports in the literature attributing low toxicity to different organic compounds of tellurium (COMPARSI et al., 2014).

In the present study, commercial AZT was used which was not toxic to MDA-MB-231 tumor cells. The commercial AZT was also tested in breast carcinoma cells (MCF-7 and MDA-231) (WAGNER ET AL., 2018) and in bladder cancer cells (MUNCHEN et al., 2018) with low cytotoxic action which indicates that the addition of the tellurium atom in the base structure of the compound increases the inhibition of tumor cells.

In this way, Du et al. tested organic compounds in colon cancer cells (HCT116) and obtained generation of O₂ radicals in cancer cells. In addition, treatment of HCT116 cells with the organotheluride resulted in G2 cell cycle arrest and induction of apoptosis (Du et al., 2014). In our study, AZT derivatives containing tellurium were not able to induce apoptosis under the experimental conditions tested as well as the compounds containing tellurium of Da Rosa and coworkers that did not induce apoptosis in the bladder carcinoma cells (DA ROSA et al., 2017).

In the analysis of the cell cycle by flow cytometry we obtained cell cycle arrest in the S phase consistent with the antimetabolite and intercalating function of the DNA of the AZT molecule (FURMAN et al., 1986). There are

literature data which corroborate our findings that AZT is responsible for cell accumulation in the S phase of the cell cycle. Our results are in agreement with other studies carried out with bladder carcinoma and AZT derivatives containing tellurium atoms, which also presented cell cycle arrest in the S phase (DA ROSA et al., 2017; MUNCHEN et al., 2018).

We also show an analysis of the combination of AZT derivatives **1a** and **1b** with doxorubicin. These combinations were, at a lower concentration, more effective at inhibiting growth than single treatment with derivatives at the same concentration, potentiating inhibition of cell growth. It may be suggested that the increase in inhibition is due to interaction with doxorubicin.

One possible explanation for the increase of the cytotoxic effect observed is the fact that doxorubicin has as one of the mechanisms of action to merge the DNA and the subsequent disruption of DNA repair mediated by topoisomerase-II (SLAMON, 2011). Similarly, AZT is incorporated into DNA by blocking the action of intracellular enzymes, such as polymerase, during replication and blocks chain elongation (GOMEZ; ARMANDO; ALONSO, 2012). In this way, the cell division of tumor cells would be compromised by the mechanism of action of the two drugs.

Another mechanism of action of doxorubicin involves oxidative stress to cell membranes, DNA and proteins (TOKARSKA-SCHLATTNER et al., 2006) effect may be potentiated by tellurium atom incorporated AZT derivative as synthetic compounds containing organotellurium have been described as antioxidant agents and the use of antioxidants is the most effective way to protect the body against cellular damage caused by oxidative stress (BANDEIRA et al., 2018).

As the *Claudin-low* epithelial-mesenchymal transition has characteristics subtype and / or biological characteristics similar to those particular stem cells have been associated with therapeutic resistance (PRAT et al., 2010). The use of combination chemotherapy with drugs is advantageous compared to monotherapy (CHOU, 2010). Although preliminary, these results indicate that the combination of AZT derivatives of DOX increase the cytotoxic potential of this drug, which could reduce the dose of administration and therefore circumvent the toxic effects and possible drug resistance carried by the body.

The antitumor activity of AZT alone was re-studied in 1997 by Wagner in which in vitro experiments AZT exhibited significant antitumor activity against lineage of MCF-7 breast cancer cells. Analysis of these data revealed that AZT was able to inhibit the proliferation of these cells over a range of concentration higher than the standard antineoplastic drug, fluroxidine (FUdR), with a 50% growth inhibition (IC_{50}) concentration of 10.0 ± 5.0 nM (Wagner et al., 1997). Studies indicate that the antineoplastic action of AZT can produce a specific inhibition of telomerase by other means, independently of its action as a chain terminator or by the shortening of the telomeres which would lead the cells to senescence and consequent death, which seems to be mediated by the p53 protein (DATTA et al., 2006; GOMEZ; ARMANDO; ALONSO, 2012).

Several trials have demonstrated that AZT alone has limited efficacy in vitro, however its combination with thymidylate synthase inhibitors has been shown to increase cytotoxicity of the drug, especially in colon câncer (BRUNETTI, 1990). Therefore, AZT was once again used to restore the sensitivity of cells resistant to some compounds, such as cisplatin, methotrexate or 5-fluorouracil (ANDREUCCETTI et al., 1996; TOSI et al., 1992).

These results indicate that the combination of AZT, with the ability to interconnect in DNA and calcogen atoms, especially Te, in a single chemical molecule represents an innovative approach in the development of new agents with antitumor potential for breast cancer, especially lineage MDA-MB-231. In this sense, tellurium proved to be a safe molecule with respect to toxicity at the doses tested and selectivity between the cancerous and healthy cells. In addition, the data point out desirable characteristics to a drug with antitumor properties as protection against oxidative stress and inhibition of overexpressed systems in cancer cells and at higher doses can cause apoptotic cell death due to the tellurium atom.

Considering the effects of **1a**, **1b** e AZT, the knowledge of its pharmacokinetic properties is important. According to *in silico* analysis, **1a**, **1b** e AZT had a good permeability in tissues of humans. In addition, the **1a**, **1b** and AZT have high penetration into the blood-brain barrier. Its metabolism is performed by the liver for all compounds. According to the simulation, the **1a**, **1b** e AZT are practically all absorbed in 24 hours in humans. In addition to this, the bioavailability of 1a, 1b e AZT in 24h is higher in humans. In this sense, the

predicted lethal dose of **1a**, **1b** e AZT in mice are relatively high, giving a good therapeutic window for the compounds. The **1a** and **1b** did not present toxicity in chromosomes, but the AZT have high toxicity in chromosomes being this mutagenic risk. In this sense, this is the main advantage of the compounds derived from AZT, not present mutagenic risk.

References

ANDREUCCETTI, M. et al. Azidothymidine in combination with 5-fluorouracil in human colorectal cell lines: In vitro synergistic cytotoxicity and DNA-induced strand-breaks. **European Journal of Cancer**, v. 32, n. 7, p. 1219–1226, 1996.

BANDEIRA, P. T. et al. Synthesis, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of N-Functionalized Organotellurides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 410–415, 2018.

BARROS, A. C. S. D. DE; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 25, n. 4, p. 146–155, 2015.

BRUNETTI, I. A. F. P. C. F. A. G. J. W. D. 5-Fluorouracil enhances azidothymidine cytotoxicity: In vitro, in vivo, and biochemical studies. **Cancer Research**, v. 50, n. 13, p. 4026–4031, 1990.

CELEWICZ, L. et al. Synthesis and anticancer activity of 5'-chloromethylphosphonates of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 21, p. 6375–6382, 2011.

CHAKRAVARTY, G. et al. Nelfinavir targets multiple drug resistance mechanisms to increase the efficacy of doxorubicin in MCF-7/Dox breast cancer cells. **Biochimie**, v. 124, p. 53–64, 2016.

CHOU, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 440–446, 2010.

COMPARSI, BRUNA; SIEBERT, PRISCILA; MARAFIGA, LARISSA; SIGNORI, DANIELA; RONCATO, JULIANA FREDO; PEDROSO, D. Farmacológicas E Toxicológicas Study of Pharmacological and Toxicological Properties Attributed To. **Saúde Integrada**, v. 7, n. 13, p. 31–56, 2014.

DA ROSA, R. M. et al. Synthesis, antioxidant and antitumoral activities of 5'-arylchalcogeno-3-aminothymidine (ACAT) derivatives. **MedChemComm**, v. 8, n. 2, p. 408–414, 2017.

DALMOLIN, M. C. et al. Straightforward microwave-assisted synthesis of organochalcogen amines by reductive amination. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 874, p. 32–39, 2018.

DATTA, A. et al. Persistent inhibition of telomerase reprograms adult T-cell leukemia to p53-dependent senescence. **Blood**, v. 108, n. 3, p. 1021–1029,

2006.

DE SOUZA, D. Síntese E Atividades Antioxidante E Antitumoral De 5'-Arlseleno Azidotimidina. **Programa de pós-graduação em ciências biológicas: Bioquímica e toxicologia**, 2012.

DENT, R. et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 15, p. 4429–4434, 2007.

DU, P. et al. A new tellurium-containing amphiphilic molecule induces apoptosis in HCT116 colon cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 6, p. 1808–1816, 2014.

EL, S. et al. Hypervalent organotellurium compounds as inhibitors of P. falciparum calcium-dependent cysteine proteases. **Parasitology International**, 2015.

FURMAN, P. A. et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 21, p. 8333–8337, 1986.

GINSBURG, O. et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. **The Lancet**, v. 389, n. 10071, p. 847–860, 2017.

GOMEZ, D. E.; ARMANDO, R. G.; ALONSO, D. F. AZT as a telomerase inhibitor. **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. September, p. 1–5, 2012.

GOULLE, J. et al. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood , plasma , urine and hair Reference values. v. 153, p. 39–44, 2005.

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biology**, v. 8, n. 5, p. 1–17, 2007.

HYUN, J. J. et al. Cyclic induction of senescence with intermittent AZT treatment accelerates both apoptosis and telomere loss. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 93, n. 3, p. 227–236, 2005.

LIVSHITS, Z.; RAO, R. B.; SMITH, S. W. An approach to chemotherapy-associated toxicity. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 32, n. 1, p. 167–203, 2014.

MITSUYA, H.; BRODER, S. Inhibition of the in vitro Infectivity and Cytopathic Effect of Human T-Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-Associated Virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-Dideoxynucleosides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 6, p. 1911–1915, 1986.

MUNCHEN, T. S. et al. New 3'-Triazolyl-5'-aryl-chalcogenothymidine: Synthesis and Anti-oxidant and Antiproliferative Bladder Carcinoma (5637) Activity. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 12, p. 3479–3486, 2018.

NOBRE, P. C. et al. Organochalcogen compounds from glycerol: Synthesis of

new antioxidants. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6242–6249, 2014.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, 2010.

R. CUNHA, I. G. L. J. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 81, p. 393–407, 2009.

SCHULTZE, E. Avaliação do efeito antitumoral in vitro de nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína sobre células de adenocarcinoma de pulmão, linhagem A549. **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal De Pelotas.**, 2013.

SHELTON, J. et al. Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 23, p. 14379–14455, 2016.

SLAMON, D. W. E. N. R. T. P. M. M. P. J. M. J. G. A. C. M. P. T. P. V. V. M.-C. L. G. S. VON M. F. V. V. B. New England Journal. **Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer**, v. 354, n. 9, p. 1663–1674, 2011.

SREDNI, B. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 1, p. 60–69, 2012.

TOKARSKA-SCHLATTNER, M. et al. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 41, n. 3, p. 389–405, 2006.

TOSI, P. et al. Azidothymidine-induced Cytotoxicity and Incorporation into DNA in the Human Colon Tumor Cell Line HCT-8 Is Enhanced by Methotrexate in Vitro and in Vivo. **Cancer Research**, v. 52, n. 15, p. 4069–4073, 1992.

WAGNER, C. R. et al. Potent growth inhibitory activity of zidovudine on cultured human breast cancer cells and rat mammary tumors. **Cancer Research**, v. 57, n. 12, p. 2341–2345, 1997.

WAGNER, M. S. et al. Revitalizing the AZT Through of the Selenium: An Approach in Human Triple Negative Breast Cancer Cell Line. **Frontiers in oncology**, v. 8, n. November, p. 525, 2018.

WANG, H. et al. Azidothymidine inhibits cell growth and telomerase activity and induces DNA damage in human esophageal cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 6, p. 4055–4060, 2017.

WEINSTEIN, J. N. et al. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. **Nature**, v. 507, n. 7492, p. 315–322, 2014.

ZHENG, X. et al. The antimetastatic effect and underlying mechanisms of thioredoxin reductase inhibitor ethaselen. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 131, n. November 2018, p. 7–17, 2019.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os compostos derivados de zidovudina foram avaliados para aplicações biológicas como agentes antitumorais contracarcinoma da mama (MDA-MB-231). Os derivados sintéticos de AZT **1a** e **1b** os quais contém moléculas de Te em sua composição, apresentaram atividade citotóxica seletiva por células tumorais de mama corroborando com o objetivo do trabalho e apresentaram melhores resultados em comparação com a molécula de AZT convencional. Esse efeito pode ocorrer devido à indução de parada do ciclo celular pelos compostos, no tratamento combinado, ambos os derivados aumentaram, significativamente, a inibição do crescimento celular na linhagem MDA-MB-231 quando comparada aos tratamentos individuais. Deste modo os derivados de AZT podem ser considerados novos candidatos a fármacos com potencial antitumoral.

6 REFERÊNCIAS

American Cancer Society. (2017). Disponível em: <https://www.cancer.org/>. Acesso em: 15/05/2017.

ARMANDO, R. G.; GOMEZ, D. M.; GOMEZ, D. E. AZT exerts its antitumoral effect by telomeric and non-telomeric effects in a mammary adenocarcinoma model. **Oncology Reports**, v. 36, n. 5, p. 2731–2736, 2016.

BARDET, C. et al. Claudin loss-of-function disrupts tight junctions and impairs amelogenesis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–4, 2017.

BARROS, A. C. S. D. DE; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 25, n. 4, p. 146–155, 2015.

BASTIANCICH, C.; BASTIAT, G.; LAGARCE, F. Gemcitabine and glioblastoma: challenges and current perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 2, p. 416–423, 2018.

BOOKMAN, M. A. Gemcitabine monotherapy in recurrent ovarian cancer: From the bench to the clinic. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 15, n. SUPPL. 1, p. 12–17, 2005.

BRABLETZ, T. et al. EMT in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 2, p. 128–134, 2018.

BROEDERS, M. et al. The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: A review of observational studies. **Journal of Medical Screening**, v. 19, n. SUPPL. 1, p. 14–25, 2012.

CAETANO-PINTO, P. et al. The importance of breast cancer resistance protein to the kidneys excretory function and chemotherapeutic resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 30, p. 15–27, 2017.

CAMPAGNA, M. C. Chemotherapy Complications. **Hospital Medicine Clinics**, v. 5, n. 3, p. 400–412, 2016.

CAREY, L. A. et al. Triple Negative Paradox : Primary T umor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. **Human Cancer Biology**, v. 13, n. 8, p. 2329–2335, 2007.

CELEWICZ, L. et al. Synthesis and anticancer activity of 5'-chloromethylphosphonates of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 21, p. 6375–6382, 2011.

CHAKRAVARTY, G. et al. Nelfinavir targets multiple drug resistance mechanisms to increase the efficacy of doxorubicin in MCF-7/Dox breast cancer cells. **Biochimie**, v. 124, p. 53–64, 2016.

CHAVEZ- MACGREGOR, M. et al. Incorporating Tumor Characteristics to the American Joint Committee on Cancer Breast Cancer Staging System. **The Oncologist**, v. 22, n. 11, p. 1292–1300, 2017.

CIRQUEIRA, M. B. et al. Effect of Ki-67 on immunohistochemical classification of luminal a to luminal B subtypes of breast carcinoma. **Breast Journal**, v. 21, n. 5, p. 465–472, 2015.

COMPARSI, BRUNA; SIEBERT, PRISCILA; MARAFIGA, LARISSA; SIGNORI, DANIELA; RONCATO, JULIANA FREDO; PEDROSO, D. Farmacológicas E Toxicológicas Study of Pharmacological and Toxicological Properties Attributed To. **Saúde Integrada**, v. 7, n. 13, p. 31–56, 2014.

CORTES, J. et al. Eribulin monotherapy versus treatment of physician ' s choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study. **The Lancet**, v. 377, n. 9769, p. 914–923, 2011.

COUTO, E.; HEMMINKI, K. Estimates of heritable and environmental components of familial breast cancer using family history information. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 11, p. 1740–1742, 2007.

DA ROSA, R. M. et al. Synthesis, antioxidant and antitumoral activities of 5'-arylchalcogeno-3-aminothymidine (ACAT) derivatives. **MedChemComm**, v. 8, n. 2, p. 408–414, 2017.

DE CLERCQ, E. Antivirals and antiviral strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 9, p. 704–720, 2004.

DE CLERCQ, E.; LI, G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 695–747, 2016.

DE SOUZA, D. Síntese E Atividades Antioxidante E Antitumoral De 5'-Arlseleno Azidotimidina. **Programa de pós-graduação em ciências biológicas: Bioquímica e toxicologia**, 2012.

DENT, R. et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 15, p. 4429–4434, 2007.

DI SIBIO, A. et al. Female breast cancer in Central and South America. **Cancer Epidemiology**, v. 44, p. S110–S120, 2016.

EL, S. et al. Hypervalent organotellurium compounds as inhibitors of P. falciparum calcium-dependent cysteine proteases. **Parasitology International**, 2015.

ELIZABETH, M. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p. 2784–2795, 2010.

FANG, X. et al. Differences in telomerase activity and the effects of AZT in aneuploid and euploid cells in colon cancer. **International Journal of Oncology**, v. 51, n. 2, p. 525–532, 2017.

FISCHER, W. A Second Note on the Term “Chalcogen”. **Journal of Chemical Education**, v. 78, n. 10, p. 1333, 2001.

FOGAÇA, T. B. et al. Apoptotic effect of chalcone derivatives of 2-acetylthiophene in human breast cancer cells. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 1, p. 156–161, 2017.

FORD, D. et al. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. **The Lancet**, v. 343, n. 8899, p. 692–695, 1994.

FORD, D. et al. Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. **The American Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 3, p. 676–689, 1998.

FURMAN, P. A. et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 21, p. 8333–8337, 1986.

GALMARINI, C. M.; MACKEY, J. R.; DUMONTET, C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. **Lancet Oncology**, v. 3, n. 7, p. 415–424, 2002.

GERDES, J. et al. PRODUCTION OF A MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY REACTIVE WITH A HUMAN NUCLEAR ANTIGEN ASSOCIATED WITH CELL PROLIFERATION. **International Journal of Cancer**, v. 31, p. 13–20, 1983.

GERHARD, R. et al. Immunohistochemical features of claudin-low intrinsic subtype in metaplastic breast carcinomas. **Breast**, v. 21, n. 3, p. 354–360, 2012.

GINSBURG, O. et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. **The Lancet**, v. 389, n. 10071, p. 847–860, 2017.

GIORDANO, S. H. Update on Locally Advanced Breast Cancer. **The Oncologist**, v. 8, n. 6, p. 521–530, 2003.

GOULLE, J. et al. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood , plasma , urine and hair Reference values. v. 153, p. 39–44, 2005.

GUPTA, P. B. et al. Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 645–659, 2009.

HENNESSY, B. T. et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell

characteristics. **Cancer Research**, v. 69, n. 10, p. 4116–4124, 2009.

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biology**, v. 8, n. 5, p. 1–17, 2007.

HIMES, D. O. et al. Breast Cancer Risk Assessment: Calculating Lifetime Risk Using the Tyrer-Cuzick Model. **Journal for Nurse Practitioners**, v. 12, n. 9, p. 581–592, 2016.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, 2011.

HORWITZ, J. P.; CHUA, J.; NOEL, M. Nucleosides. V. The monomesylates of 1-(2'-deoxy-beta-D-lyxofuranosyl)thymidine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 2076–2078, 1964.

HUANG, P. et al. Action of 2', 2'-difluorodeoxycytidine on DNA Synthesis. **Cancer Research**, v. 51, p. 6110–6117, 1991.

HYUN, J. J. et al. Cyclic induction of senescence with intermittent AZT treatment accelerates both apoptosis and telomere loss. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 93, n. 3, p. 227–236, 2005.

J., S. et al. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 20, p. 6956–6961, 2004.

JHAN, J.; ANDRECHEK, E. R. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. v. 18, p. 1595–1609, 2017.

JORDHEIM, L. P. et al. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 6, p. 447–464, 2013.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 2009–2010, 2009.

KUMAR, S. et al. Antioxidant profile of ethoxyquin & S, Se, Te analog. **J. Org. Chem.**, v. 72, n. 16, p. 6046–6055, 2007.

KY, B. et al. Early increases in multiple biomarkers predict subsequent cardiotoxicity in patients with breast cancer treated with doxorubicin, taxanes, and trastuzumab. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 8, p. 809–816, 2014.

LEE, A. M. B. A. D. Triple negative breast cancer: emerging therapeutic modalities and novel combination therapies. **Cancer Treatment Reviews**,

2017.

LEVENE, P. A., & JACOBS, W. A. Dritte mitteilung. **Aus dem Rockefeller institute for Medical research**, v. 41, p. 1198–1203, 1909.

LI, H. et al. Effect of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine (AZT) on Telomerase Activity and Proliferation of HO-8910 Cell Line of Ovarian Cancer. **International Journal of Biomedical Science : IJBS**, v. 2, n. 1, p. 34–40, 2006.

LI, Y. et al. EPHA5 mediates trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancers through regulating cancer stem cell-like properties. **The FASEB Journal**, p. fj.201701561RRR, 2019.

LIVSHITS, Z.; RAO, R. B.; SMITH, S. W. An approach to chemotherapy-associated toxicity. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 32, n. 1, p. 167–203, 2014.

MAGGARD, M. A. et al. Do young breast cancer patients have worse outcomes? **Journal of Surgical Research**, v. 113, n. 1, p. 109–113, 2003.

MIGOWSKI, A. et al. Diretrizes para detecção precoce do câncer de mama no Brasil. II - Novas recomendações nacionais, principais evidências e controvérsias. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 1–16, 2018.

MITSUYA, H.; BRODER, S. Inhibition of the in vitro Infectivity and Cytopathic Effect of Human T-Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-Associated Virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-Dideoxynucleosides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 6, p. 1911–1915, 1986.

MOO, T. A. et al. Overview of Breast Cancer Therapy. **PET Clinics**, v. 13, n. 3, p. 339–354, 2018.

MUNCHEN, T. S. et al. New 3'-Triazolyl-5'-aryl-chalcogenothymidine: Synthesis and Anti-oxidant and Antiproliferative Bladder Carcinoma (5637) Activity. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 12, p. 3479–3486, 2018.

NEWELL, M.; BRUN, M.; FIELD, C. J. Treatment with DHA Modifies the Response of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells and Tumors from *nu/nu* Mice to Doxorubicin through Apoptosis and Cell Cycle Arrest. **The Journal of Nutrition**, p. 1–11, 2019.

NIELSEN, T. O. et al. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 919, p. 5367–5374, 2004.

NIETO, M. A. Epithelial plasticity: A common theme in embryonic and cancer cells. **Science**, v. 342, n. 6159, 2013.

NOBRE, P. C. et al. Organochalcogen compounds from glycerol: Synthesis of new antioxidants. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6242–6249, 2014.

OGRA, Y. Biology and toxicology of tellurium explored by speciation analysis. **Metallomics**, v. 9, n. 5, p. 435–441, 2017.

OUBAN, A.; AHMED, A. A. Claudins in human cancer: A review. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 1, p. 83–90, 2010.

PARK, M.; BERTOS, N. R. Breast cancer — one term, many entities? **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 10, p. 3789–3796, 2011.

PAULA, L. B. DE et al. OS GENES BRCA1 E BRCA2 E SUAS RELAÇÕES GENÉTICAS NA PREDISPOSIÇÃO AOS CARCINOMAS MAMÁRIOS HEREDITÁRIOS E ESPORÁDICOS*. **Estudos**, v. 37, p. 837–850, 2010.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Letters to nature**, v. 533, n. May, p. 747–752, 2000.

PEROU, C. M. Molecular Stratification of Triple-Negative Tumors. p. 39–48, 2010.

PETROVA, Y. I.; SCHECTERSON, L.; GUMBINER, B. M. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. **Molecular Biology of the Cell**, v. 27, n. 21, p. 3233–3244, 2016.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, 2010.

R. CUNHA, I. G. L. J. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 81, p. 393–407, 2009.

RAFFO, C. C. et al. Perfil histológico e imuno-histoquímico das pacientes com câncer de mama operadas no Hospital Santa Casa de Curitiba no período de 2014 e 2015. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 62, n. 3, p. 139–145, 2017.

REESE, N. D.; SCHILLER, G. J. High-dose cytarabine (HD araC) in the treatment of leukemias: A review. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 8, n. 2, p. 141–148, 2013.

ROWLAND, E. et al. Preparing young people for future decision-making about cancer risk in families affected or at risk from hereditary breast cancer: A qualitative interview study. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 25, p. 9–15, 2016.

RÜFFER, C.; GERKE, V. The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and

endothelial tight junctions. **European Journal of Cell Biology**, v. 83, n. 4, p. 135–144, 2004.

SARMA, B. K. et al. Synthesis, structure, spirocyclization mechanism, and glutathione peroxidase-like antioxidant activity of stable spirodiazaselenurane and spirodiazatellurane. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 15, p. 5364–5374, 2010.

SÁS, D. M. Mutações em genes de predisposição para câncer de mama em pacientes brasileiros de risco . “ Júlio de Mesquita Filho ” INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU Mutações em genes de predisposição para câncer de mama em pacientes brasileiros de risco . 2015.

SCHULTZE, E. Avaliação do efeito antitumoral in vitro de nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína sobre células de adenocarcinoma de pulmão, linhagem A549. **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal De Pelotas.**, 2013.

SELEY-RADTKE, K. L.; YATES, M. K. The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. **Antiviral Research**, v. 154, p. 66–86, 2018a.

SELEY-RADTKE, K. L.; YATES, M. K. The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. **Antiviral Research**, v. 154, p. 66–86, 2018b.

SHELTON, J. et al. Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 23, p. 14379–14455, 2016.

SILVA, P. A. DA; RIUL, S. DA S. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, n. 6, p. 1016–1021, 2011.

SIMONA MARIA FRAGOMENI, ANDREW SCIALIS, J. S. J. HHS Public Access. v. 27, n. 1, p. 95–120, 2018.

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8418–8423, 2003.

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

SØRLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: Tumour subtypes as distinct disease entities. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667–2675,

2004.

SØRLIE, T. et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant different platforms. **BMC Genomic**, v. 7, p. 127, 2006.

SREDNI, B. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 1, p. 60–69, 2012.

TABARELLI, G. et al. Synthesis and Antitumoral Lung Carcinoma A549 and Antioxidant Activity Assays Of New Chiral β -Aryl-Chalcogenium Azide Compounds. **ChemistrySelect**, v. 2, n. 27, p. 8423–8430, 2017.

TANNER, M. et al. Chromogenic in situ hybridization: A practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. **American Journal of Pathology**, v. 157, n. 5, p. 1467–1472, 2000.

TAYLOR, N. A. et al. Treg depletion potentiates checkpoint inhibition in claudin-low breast cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 9, p. 3472–3483, 2017.

TELLI, M. L. et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple Negative Breast Cancer. 2016.

TOKARSKA-SCHLATTNER, M. et al. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 41, n. 3, p. 389–405, 2006.

TOSCHI, L. et al. Role of gemcitabine in cancer therapy. **Future Oncology**, v. 1, n. 1, p. 7–17, 2005.

TURK, G. et al. Antiretroviral activity and cytotoxicity of novel zidovudine (AZT) derivatives and the relation to their chemical structure. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, n. 4, p. 282–288, 2002.

TURNER, N. C.; REIS-FILHO, J. S. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. **Oncogene**, v. 25, n. 43, p. 5846–5853, 2006.

WAGNER, C. R. et al. Potent growth inhibitory activity of zidovudine on cultured human breast cancer cells and rat mammary tumors. **Cancer Research**, v. 57, n. 12, p. 2341–2345, 1997.

WAGNER, M. S. et al. Revitalizing the AZT Through of the Selenium: An Approach in Human Triple Negative Breast Cancer Cell Line. **Frontiers in oncology**, v. 8, n. November, p. 525, 2018.

WANG, H. et al. Azidothymidine inhibits cell growth and telomerase activity and induces DNA damage in human esophageal cancer. **Molecular Medicine**

Reports, v. 15, n. 6, p. 4055–4060, 2017.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997–4013, 2013.

WU, D. et al. Design, synthesis, and antitumor activity of bile acid-polyamine-nucleoside conjugates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 11, p. 2983–2986, 2007.

YAMAUCHI, H.; TAKEI, J. Management of hereditary breast and ovarian cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 1, p. 45–51, 2018.

YANG, J.; WEINBERG, R. A. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. **Developmental Cell**, v. 14, n. 6, p. 818–829, 2008.

YANG, X. R. et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: A pooled analysis from the breast cancer association consortium studies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 3, p. 250–263, 2011.

YASUI, K. et al. MicroRNA-3662 expression correlates with antiviral drug resistance in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 501, n. 4, p. 833–837, 2018.

ZIMMER, A. S. et al. Analysis of breast cancer in young women in the Department of Defense (DOD) database. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 168, n. 2, p. 501–511, 2018.